

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger
Ernst-Heydemann-Str. 8
18057 Rostock

1. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Dipl.-Ing. Rainer Bader
Universitätsmedizin Rostock, Orthopädische Klinik und Poliklinik
Forschungslabor für Biomechanik und Implantattechnologie
Doberaner Straße 142
18057 Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. J.G. Barbara Nebe
Universitätsmedizin Rostock
Zentrum für Medizinische Forschung
Arbeitsbereich Zellbiologie
Schillingallee 69
18057 Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Christoph H. Lohmann
Universitätsklinikum Magdeburg A. ö. R.
Orthopädische Universitätsklinik
Leipziger Str. 44
39120 Magdeburg

Datum der Einreichung: 25. März 2015

Datum der Verteidigung: 04. November 2015

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der
Universitätsmedizin Rostock
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. Wolfram Mittelmeier)

**Experimentelle Untersuchungen zur Kollagenproduktion
und Zytokinsynthese humaner Osteoblasten nach Kontakt
mit Abriebpartikeln aus der Grenzfläche von
Hüftendoprothesen-Stiel und Knochenzement**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

Vorgelegt von
Robert Lenz
aus Rostock

Rostock, März 2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die aseptische Lockerung – Hauptursache für die Hüftendoprothesenrevision	1
1.2. Aufgabenstellung und Zielsetzung	8
2. Material und Methoden	11
2.1. Partikel und Herstellung	11
2.1.1. Generierung von Abriebprodukten im Partikelprüfstand	11
2.1.2. Prüfobjekte	13
2.1.3. Kommerzielle Referenzpartikel	14
2.2. Charakterisierung der Abriebprodukte	14
2.2.1. Quantitative Analyse	14
2.2.2. Bestimmung metallischen Abriebs in den nativen Destruktionsprodukten mittels Atomabsorptionsspektrometrie	15
2.2.3. Bestimmung der Partikelgröße	17
2.3. Präparation der Partikel für die zellbiologischen Untersuchungen	18
2.4. Zellbiologische Untersuchungen	19
2.4.1. Isolierung und Kultivierung humaner Osteoblasten	19
2.4.2. Zellkonservierung	21
2.4.3. Immunhistochemie	22
2.4.4. Inkubation humaner Knochenzellen mit Partikeln	23
2.4.5. Bestimmung des Zellüberlebens mittels MTT-Test	23
2.4.6. Bestimmung der Synthesemenge von Prokollagen Typ I	24
2.4.7. Analyse der Zytokin-Synthese	25
2.5. Statistische Analyse	26
3. Ergebnisse	27
3.1. Ergebnisse der Partikelcharakterisierung	27
3.2. Einfluss verschiedener Partikel auf das Zellüberleben humaner Osteoblasten	29
3.3. Einfluss verschiedener Partikel auf die Prokollagen Typ I Synthese	30
3.4. Einfluss verschiedener Partikel auf die Zytokin-Produktion	32
4. Diskussion	35
4.1. Generierung und Charakterisierung der Abriebprodukte	39
4.2. Zellbiologische Effekte der Abriebpartikel	43
4.3. Limitationen der Arbeit und Ausblick	54
5. Zusammenfassung	57
6. Verzeichnisse	61
6.1. Literaturverzeichnis	61
6.2. Abbildungsverzeichnis	69
6.3. Tabellenverzeichnis	72
6.4. Chemikalienverzeichnis	73
6.5. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	76
7. Anhang	78
7.1. Danksagung	78
7.3. Selbständigkeitserklärung	79
7.4. Thesen	80

1. Einleitung

1.1. Die aseptische Lockerung – Hauptursache für die Hüftendoprothesen-revision

Die Hüftendoprothetik ist ein effektives und weltweit etabliertes Verfahren für die Wiederherstellung einer adäquaten Gelenkfunktion bei irreversibler Störung der Gelenkarchitektur. Insbesondere bei arthrotisch deformierten Gelenken mit traumatischer oder entzündlicher Genese trägt der künstliche Gelenkersatz zu einer deutlichen Verbesserung der Gelenkbeweglichkeit und der Lebensqualität nach erfolgreicher Operation bei (Goodman, Lind et al. 1998).

Derzeit werden laut Angaben des statistischen Bundesamtes in Deutschland jährlich ca. 200.000 Hüftendoprothesen implantiert mit anhaltender Tendenz (Herberts and Malchau 2000). Die demographische Entwicklung mit einer Zunahme älterer aktiver Menschen resultiert in stetig steigenden Qualitätsansprüchen. Da auch jüngere Patienten nicht selten betroffen sind, erfordert dies eine dauerhafte Fixation und anhaltend gute Funktion der Endoprothese bei allen Patienten, um die Zahl der Folgeeingriffe auf einem Minimum zu halten (Chang, Mann et al. 1998; Breusch, Aldinger et al. 2000; Ostendorf, Johnell et al. 2002). Derzeit sind Standzeiten von 15 Jahren und länger gefordert und von über 90% der implantierten Hüftendoprothesen zu erwarten (Herberts and Malchau 2000). Dennoch sind frühzeitige Revisionsoperationen nicht selten und stellen für Patient und Operateur eine Herausforderung dar.

Für das Frühversagen eines künstlichen Hüftgelenkes können verschiedene Ursachen benannt werden. Neben Infektionen, Luxationen, Knochen- und Implantatbrüchen gilt die aseptische Lockerung als die häufigste Ursache einer verkürzten Implantatstandzeit (Bischoff, Freeman et al. 1994; Bi, Seabold et al. 2001; Bader, Scholz et al. 2004; Streit, Merle et al. 2011; Hudetz, Rod et al. 2012).

Eine entscheidende Bedeutung für die Standzeit einer Hüftendoprothese haben zusätzlich auch die Operationstechnik, die Erfahrung des Operateurs und Patienten-bezogenen Faktoren, wie Alter, Geschlecht, Körpergewicht und -größe, Aktivität und Knochenqualität (Breusch, Schneider et al. 2000; Morscher 2003; Pedersen, Mehnert et al. 2010; McCalden, Charron et al. 2011).

Trotz aller genannten Faktoren stellt die aseptische Lockerung (Abbildung 1) eine der schwerwiegendsten Komplikationen nach Implantation eines künstlichen

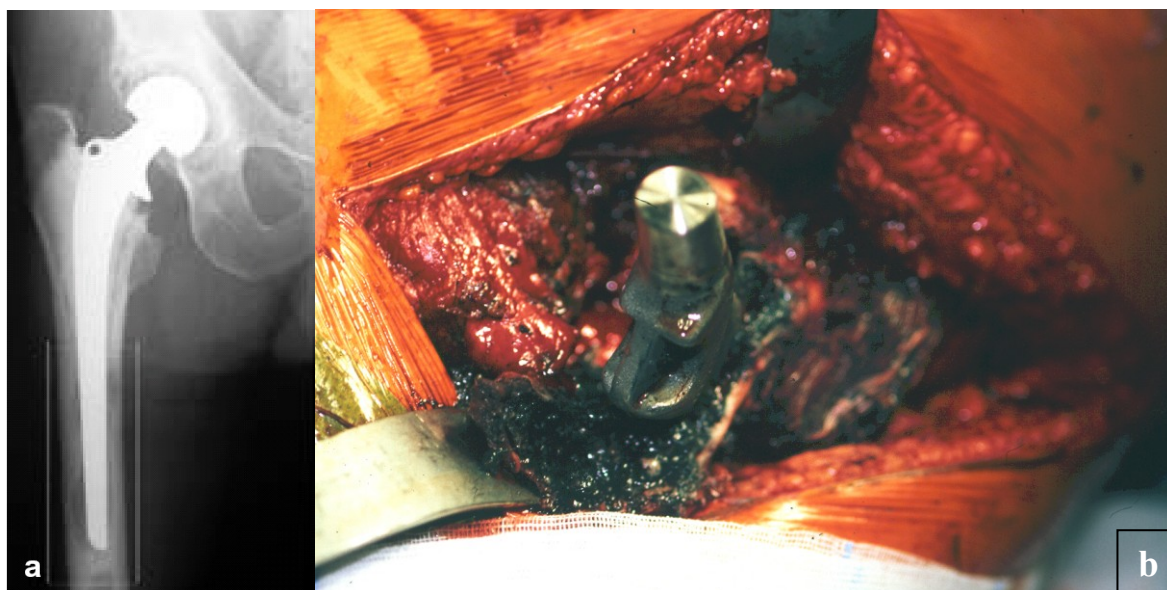


Abbildung 1:

- a) Röntgenaufnahme einer zementierten Hüftendoprothese mit typischen Lysezonen im Bereich des distalen Stiels als Zeichen einer aseptischen Lockerung,
- b) Intraoperativer Situs einer Hüftendoprothesen-Wechseloperation mit Darstellung schwarz gefärbten granulomatösen Gewebes durch metallischen Abrieb um den Endoprothesenstiel

Hüftgelenkersatzes dar und macht einen hohen Anteil der Revisionseingriffe aus (Willert et Semlitsch 1977; Amstutz, Cuckler et al. 1993; Friedman, Black et al. 1993; Herberts et Malchau 2000).

Verantwortlich für den Lockerungsvorgang sind Reaktionen des periprotetischen Gewebes auf freigesetzte Abriebpartikel. Daher wird in der angloamerikanischen Literatur auch häufig der Begriff „wear disease“ verwendet. Abriebpartikel können an unterschiedlichen Grenzflächen modular aufgebauter Endoprothesen z.B. der Gleitfläche Endoprothesenkopf-Pfanne entstehen, aber auch zwischen Implantat und Knochen respektive Implantat und Knochenzement (Willert et Semlitsch 1976; Bischoff, Freeman et al. 1994; Willert, Brobäck et al. 1996; Willert, Buchhorn et al. 1996; Goodman, Lind et al. 1998; Rubash, Sinha et al. 1998).

Es herrscht weitgehende Akzeptanz über die Initiierung einer Entzündungsreaktion im angrenzenden Gewebe auf Abriebpartikel, die durch komplexe Interaktionen zwischen Makrophagen, Fibroblasten, Osteoblasten, Osteoklasten und anderen

Gewebszellen ausgelöst wird (Rubash, Sinha et al. 1998; Purdue, Koulouvaris et al. 2006; Purdue, Koulouvaris et al. 2007).

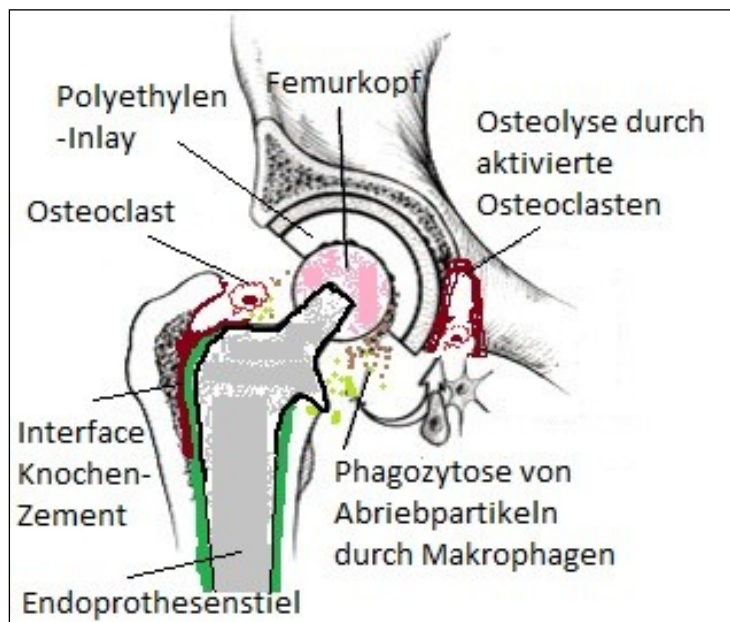


Abbildung 2:

Schematische Übersicht zur Pathophysiologie der aseptischen Lockerung. Unterschiedliche Abriebpartikel bilden das zentrale Element in der Aktivierung gewebsständiger Zellen mit Aktivierung osteolytischer Prozesse.

Hierbei erfolgt die interzelluläre Kommunikation über verschiedene Mediatoren wie Interleukine, Matrix-Metalloproteinasen und andere Gewebsfaktoren (z.B. PG-E₂, TNF- α).

Histologische Untersuchungen zeigten zahlreiche Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen, die nach Phagozytose von Partikeln verschiedene Zellmediatoren freisetzen und anscheinend damit eine Schlüsselrolle im periprothetischen Gewebe gelockerter Hüftendoprothesen einnehmen (Abbildung 2) (Glant, Jacobs et al. 1993; Shanbhag, Jacobs et al. 1995; Goodman, Knoblich et al. 1996). Die phagozytierten Abriebpartikel akkumulieren im weiteren Verlauf im Gewebe, da der Enzymbesatz der Zellen nicht imstande ist eine Verdauung des Detritus zu erwirken. In dieser ständigen Auseinandersetzung werden anhaltend verschiedene Zellbotenstoffe (Mediatoren) freigesetzt.

Petit et al. postulierten, dass eine Störung des natürlichen Zelltodes der Makrophagen in der chronisch entzündlich veränderten Umgebung für die konstante Aufrechterhaltung der Mediatorenfreisetzung sorgen (Petit, Catelas et al. 2002).

Insbesondere stimuliert durch die Anwesenheit von Zytokinen wie z.B. Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) kommt es

zu einer Proliferationssteigerung sowie Aktivierung von Osteoklasten. In dieser Kaskade spielen aber auch andere Kontrollproteine wie z.B. RANKL und Osteoprotegerin eine bedeutende Rolle. Kim et al. beispielsweise konnten in histologischen Analysen erniedrigte Konzentration von Osteoprotegerin nachweisen, welches als Gegenspieler zur TNF- α ausgelösten Osteoklastogenese fungiert (Kim, Kotake et al. 2001).

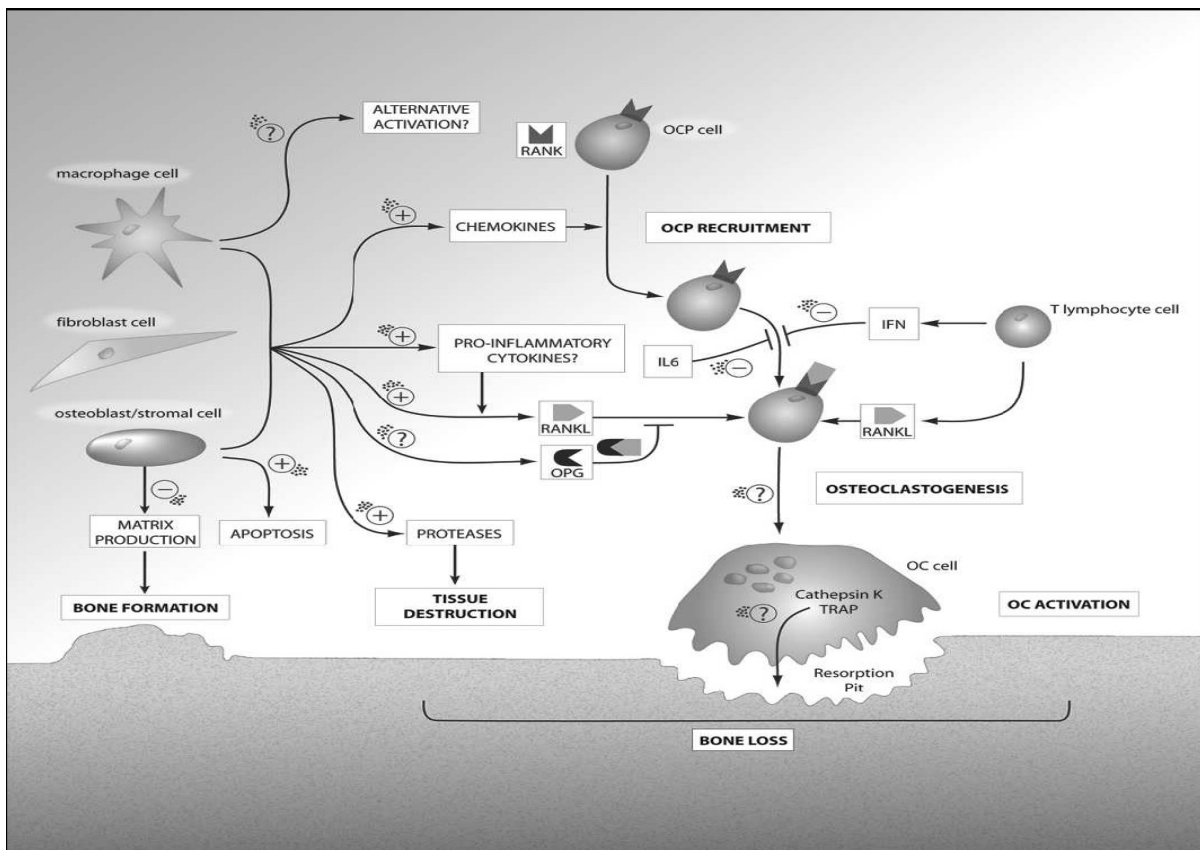


Abbildung 3:

Komplexe Regulationsmechanismen des Abriebpartikel-induzierten Knochenverlustes. Differenzierung von Vorläuferzellen (OCP) im peri-prothetischen Gewebe zu aktiven Osteoklasten (OC). Knochenresorption durch osteolytische Enzyme wie Cathepsin K, Tartat-resistente saure Phosphatase (TRAP) und Carboanhydrase II (CAII). Interaktion durch verschiedene Zellmediatoren (RANKL, Osteoprotegerin (OPG), Interferon-gamma (IFN)). (aus Purdue et al. 2007)

Die dadurch ausgelöste Differenzierung und Ausreifung von Osteoklasten verändert das Gleichgewicht des Knochenstoffwechsels (Abbildung 3), und es resultiert eine Schwächung des periprothetischen Knochengewebes (Haynes, Rogers et al. 1993; Ingham, Green et al. 2000; Purdue, Koulouvaris et al. 2007).

Vergleichsweise wenig ist aktuell über die Rolle der Osteoblasten bekannt. Die Arbeitsgruppe um Vermes et al. konnte eine Phagozytoseaktivität von Osteoblasten nachweisen. Der Partikelkontakt hat dabei negative Effekte auf die Zellaktivität mit einer verminderten Synthese extrazellulärer Matrix wie z.B. Kollagen I (Vermes, Chandrasekaran et al. 2001; Vermes, Glant et al. 2001).

Die reduzierte Knochenbildung bewirkt somit zusätzlich eine Störung der ossären Homöostase (Vermes, Chandrasekaran et al. 2001). Das Ergebnis ist die Entstehung eines periprothetischen Gewebes (Abbildung 1b) mit folgender Endoprothesenlockerung (Goodman, Lind et al. 1998; Santavirta, Xu et al. 1998; Ingham, Green et al. 2000; Gallo, Kamínek et al. 2002).

Nicht zufriedenstellende klinische Ergebnisse in der Vergangenheit gaben daher Anlass für Diskussionen über eine Verbesserung der Langzeitergebnisse zementierter Hüftendoprothesen. Als mögliche Einflussfaktoren und Ansatz für Modifikationen gelten Werkstoff, Oberflächenbeschaffenheit und Design des Hüftendoprothesen-Stiels einerseits, als auch der Knochenzement andererseits (Davies, Singer et al. 1992; Chang, Mann et al. 1998; Collis and Mohler 1998; Bowditch and Villar 2001; Collis and Mohler 2002). Bezüglich des Knochenzementes spielen die Zusammensetzung, Viskosität, Zementiertechnik und Zementmanteldicke eine große Rolle (Ebramzadeh, Sarmiento et al. 1994; Breusch, Schneider et al. 2000).

Es wurden zahlreiche Versuche unternommen, über die Modifikation von Materialzusammensetzung, Oberflächenbeschaffenheit sowie Design des zementierten Hüftendoprothesenstiels die Standzeiten positiv zu beeinflussen (Crowninshield, Jennings et al. 1998; Rasquinha, Ranawat et al. 2004). Hierbei konnte insbesondere gezeigt werden, dass eine Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit von rau zu glatt den Implantatabrieb deutlich reduzieren kann (Anthony, Gie et al. 1990; Collis and Mohler 2002).

Raue Endoprothesenoberflächen scheinen die Erzeugung von Abrieb zu fördern, da diese vor allem nach dem „Debonding“ zu einer ungleichmäßigen Lastverteilung an der Grenzfläche Implantat-Zement führen (Barrack 2000; Mcgrath, Shardlow et al.

2001; Collis and Mohler 2002; Duffy, Lozynsky et al. 2006). „Debonding“ entsteht, wenn der feste Verbund zwischen rauem Stiel und Zement, der anfangs durch die aufgeraute Oberfläche besteht, auf Dauer nicht aufrechterhalten werden kann, und sich der Stiel vom Zement löst (Davies, Singer et al. 1992; Chang, Mann et al. 1998; Breusch, Aldinger et al. 2000).

Dies hat entscheidende Auswirkungen auf den Progress einer aseptischen Lockerung. Willert et al. postulierten, dass es bei zementierten Hüftendoprothesen durch Relativbewegungen zwischen Implantat und Knochenzement zur Generierung von Abriebpartikeln kommt, die aufgrund von Korrosionsprozessen und daraus resultierender Spaltbildung und Verlust der Verbindung von Zement und Implantat in das umliegende Gewebe gelangen können (Willert, Brobäck et al. 1996). Andere Autoren beschreiben darüber hinaus Mikrobewegungen und Zementmantelbrüche, die es den Partikeln ermöglichen, in den Knochen zu penetrieren (Brien, Salvati et al. 1992; Schmalzried, Zahiri et al. 2000; Hirakawa, Jacobs et al. 2004). In diesem Zusammenhang kommt erneut die Bedeutung einer korrekten Zementiertechnik mit Beachtung der spezifischen mechanischen Eigenschaften z.B. Viskosität und Aushärtung zum Ausdruck. Ziel sollte stets eine ausreichende Zementmanteldicke ohne Einschluss von Luft bzw. Flüssigkeiten sein (Breusch, Schneider et al. 2000).

Bei Kontakt der Abriebpartikel mit dem umliegenden Gewebe kommt es zur Phagozytose und Einsetzen der Entzündungsreaktion (Willert et Semlitsch 1977; Goodman 2007). In der Literatur wird diesbezüglich auf den Einfluss von Zusammensetzung, Größe, Form und Menge der Abriebprodukte auf die Zellreaktionen und Veränderungen des Gewebes hingewiesen (Ingham, Green et al. 2000; Bi, Van De Motter et al. 2001; O'Connor, Choi et al. 2004; Choi, Koh et al. 2005; Ingram, Kowalski et al. 2005).

Neben den Oberflächenmodifikationen bieten auch die verwendeten Werkstoffe Anlass zur Diskussion. Es herrschen bis heute kontroverse Meinungen darüber, ob Titan-Basis-Legierungen weiterhin bei zementierten Hüftendoprothesen-Stielen klinisch eingesetzt werden sollen (Schöll, Eggli et al. 2000). In der Literatur wird auch von guten Erfolgsraten solcher Stiele berichtet (Eingartner, Volkmann et al. 1997; Bowditch and Villar 2001; Eingartner, Ihm et al. 2002).

Titan und seine Legierungen zeichnen sich durch günstige physikalische Eigenschaften und hohe biologische Verträglichkeit aus. In der Orthopädischen Chirurgie ist Titan aufgrund des exzellenten Einwachsens in den Knochen und gute

Korrosionsbeständigkeit einer der am häufigsten verwendeten Werkstoffe (Haynes, Rogers et al. 1993; Long and Rack 1998). In der Hüftendoprothetik haben sich heutzutage Titanlegierungen bei zementfreien Modellen durchgesetzt (Eingartner, Volkmann et al. 2000). Bei manchen Modellen zementierter Stiele auf Titan-Basis wurden dagegen sehr hohe Frühlockerungsraten beobachtet (Schöll, Eggli et al. 2000; Jergesen and Karlen 2002; Hallan, Espehaug et al. 2012). Hauptursache war auch hier die aseptische Implantatlockerung ausgelöst durch Abriebvorgänge an den Titan-Stielen (Schöll, Eggli et al. 2000). Essentiell für die Aufrechterhaltung der Korrosionsbeständigkeit und Abriebfestigkeit von Implantaten auf Titan-Basis ist eine stabile Passivierungsschicht aus Titanoxid (Boyer, Lazennec et al. 2009). Diese kann bei ausreichender Sauerstoffzufuhr im Körpermilieu entstehen. Bei zementierten Stielen ist jedoch die Sauerstoffzufuhr limitiert. Kommt es nun zu Relativbewegungen im Interface Endoprothesenstiel und Knochenzement, wird die dünne Titanoxidschicht an der Implantatoberfläche abgerieben. Freigesetzte Titan-Ionen können auf diese Weise mit Chlorid-Ionen reagieren, und es kommt zur Bildung saurer Metabolite. Diese beschleunigen die Korrosionsvorgänge an der Stiel-Oberfläche und begünstigen eine weitere Freisetzung von Abriebprodukten (Willert, Brobäck et al. 1996; Schöll, Eggli et al. 2000).

Neben Titan kommen auch Kobalt-Chrom-Legierungen in der Hüftendoprothetik zur Anwendung. Diese besitzen einen vergleichsweise höheren Elastizitätsmodul und zeichnen sich durch höhere Festigkeit aus (Ungethüm et Winkler-Gniewek 1984; Cheal, Spector et al. 1992). Die hohe Korrosionsbeständigkeit und der höhere Verschleißwiderstand werden für geringere Frühlockerungsraten zementierter Stiele aus Kobalt-Chrom im Vergleich zu Titanlegierungen verantwortlich gemacht (Bischoff, Freeman et al. 1994). Die allergene Potenz sowie die bislang nicht ausgeschlossene Karzinogenität der Legierungsbestandteile stellt sich als nachteilig dar (Salvati, Betts et al. 1993; Kręcis, Kieć-Świerczyńska et al. 2012). Eine Anwendung bei bestehender Metallsensitivität kann gegenwärtig nicht empfohlen werden.

Nicht vollständig geklärt ist die Reaktion der metallischen Partikel auf zellulärer Ebene. Eine zelltoxische Wirkung von Kobalt-Chrom-Partikeln ist bekannt (Howie, Rogers et al. 1996). Unklar bleibt inwieweit dabei die Stimulation pro-osteolytischer Mediatoren beeinflusst wird. Die geringere Zelltoxizität der Titanpartikel im Vergleich zu Kobalt-Chrom-Partikeln scheint in diesem Zusammenhang von Bedeutung zu

sein. Während die Partikel aus Kobalt-Chrom-Legierungen eher zum Zelltod führen, wird eine Stimulation der Synthese und Abgabe von Entzündungsmediatoren, die für die Knochenresorption verantwortlich sind, den weniger toxischen Titan-Partikeln zugeschrieben (Haynes, Rogers et al. 1993).

Zahlreiche In-vivo- und In-vitro-Untersuchungen zum genauen Verständnis der aseptischen Lockerung wurden in der Vergangenheit angestellt, unter anderem mit dem Ziel valide Messinstrumente zum Auftreten und der Prognose der Hüftendoprothesenstandzeit zu erstellen (Goodman, Lind et al. 1998; Boyer, Lazennec et al. 2009; Maier, Eberhardt et al. 2014; Smith et Schwarz 2014).

Dabei lassen sich biologische, physikalische und biophysikalische Ansätze differenzieren. In der Beschreibung zellbiologischer Mechanismen stützt sich die gegenwärtige Literatur in der Mehrheit der Studien auf die Effekte von Abriebpartikeln auf angrenzende Zell- und Gewebetypen. In einigen Studien wurden kommerzielle Titan-Partikel und deren Effekt auf verschiedene Zellen getestet, andere Studien bedienten sich an Partikeln, die aus periprotetischen Membranen isoliert wurden, wiederum andere generierten beispielsweise Zementpartikel und führten diese zellbiologischen Untersuchungen zu (Ingham, Green et al. 2000; Bi, Van De Motter et al. 2001; Akisue, Bauer et al. 2002). Es liegen nur wenige Arbeiten, die sich konkret mit generierten Partikeln aus dem Interface zwischen Endoprothese und Knochenzement beschäftigen, vor (Lenz, Mittelmeier et al. 2009). Auch finden unterschiedliche Oberflächenmodifikationen der Implantate bisher keine ausreichende Berücksichtigung in der Analyse der Zellantwort auf Abriebpartikel.

1.2. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ein bisher nicht ausreichend gelöstes Problem in der Hüftendoprothetik ist die aseptische Implantatlockerung. Die durch Abriebpartikel induzierte Entzündungsreaktion folgt dabei einer Kaskade von Interaktionen ortsständiger Zellen bei denen unterschiedliche Mediatoren eine Rolle spielen. Eine Störung der Knochenhomöostase ist die Folge. Bisher wurden überwiegend die Zellreaktionen von Osteoklasten und Makrophagen auf unterschiedliche Abriebpartikel untersucht. Inwieweit Osteoblasten das freigesetzte Zytokinprofil beeinflussen, ist bisher unklar.

Ausgehend von klinischen Studien, die sich mit der Frage der Stielmodifikation zementierter Hüftendoprothesen beschäftigten, wurden Beobachtungen bezüglich Werkstoff, Oberflächenmodifikationen und Stiel-Design hinsichtlich des Outcomes angestellt. Auch der Knochenzement scheint einen Einfluss auf die Erfolgsrate einer zementierten Hüftendoprothese zu haben (Bischoff, Freeman et al. 1994; Bader, Scholz et al. 2004; Ingram, Kowalski et al. 2005). Nur wenige Studien analysierten bisher die zelluläre Antwort nach entsprechenden Veränderungen im Interface von Implantat und Knochenzement. Für das weitere Verständnis der aseptischen Lockerung ist daher eine gezielte Analyse der o.g. Einflussfaktoren in einem kontrollierten reproduzierbaren Ansatz zu fordern.

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe eines In-vitro-Modells, verschiedene Einflussfaktoren auf die Zellantwort zu evaluieren. Ein Teilaspekt der Arbeit ist dabei die reproduzierbare Herstellung von Abriebprodukten in der Grenzfläche Implantat und Knochenzement in einer speziellen Prüfvorrichtung (Bader, Steinhauser et al. 2004). Insbesondere soll dabei auf den Werkstoff und die Oberflächenbeschaffenheit des Stiels eingegangen werden. Mittels verschiedener Methoden sollen die generierten Abriebprodukte hinsichtlich Abriebmenge, Zusammensetzung, und morphologischer Parameter analysiert werden.

Nach Charakterisierung der Abriebpartikel sollen diese zellbiologischen Untersuchungen zugeführt werden. Aussagen über das Zellverhalten humaner Osteoblasten auf die Partikel sind abzuleiten. Dabei wird deren Einfluss auf Zellüberleben, Zellstoffwechsel und Kollagensynthese anhand verschiedener Marker sowie die Expression von Zytokinen im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Partikeln quantifiziert.

Zusammenfassend sind folgende Ziele definiert:

- Untersuchung des Abrasionsverhaltens von zementierten Hüftendoprothesen mittels einer speziellen Prüfvorrichtung unter Berücksichtigung von Werkstoff- und Oberflächenmodifikationen
- Reproduzierbare Erzeugung von Abriebprodukten aus der Grenzfläche zwischen Endoprothesenstiel und Knochenzement
- Aufbereitung und Charakterisierung der generierten Abriebpartikel mittels verschiedener Methoden

- Kultivierung primärer humaner Osteoblasten und Inkubation mit generierten sowie mit kommerziell erhältlichen Partikeln
- Analyse der Zellreaktionen auf die verschiedenen Partikelentitäten hinsichtlich Zellaktivität (Zellüberleben, Syntheseleistung) und Kommunikation durch Freisetzung bzw. Synthese von Mediatoren/Zytokinen

2. Material und Methoden

Der methodische Ansatz lässt sich in zwei Bereiche untergliedern. An erster Stelle steht die Analyse des Abriebverhaltens zementierter Hüftendoprothesenstiele hinsichtlich quantitativer und qualitativer Merkmale. Mit Hilfe eines Partikelprüfstands soll hierzu die notwendige Reproduzierbarkeit der Abriebpartikel gewährleistet werden. Die ermittelten Abriebdaten sollen im Weiteren mit den gewonnenen Ergebnissen aus zellbiologischen Untersuchungen korreliert werden.

Um die zellulären Reaktionen auf Abriebprodukte aus der Grenzfläche zwischen Hüftendoprothesenstiel und Knochenzement einordnen zu können, werden den im Partikelprüfstand generierten Abriebpartikeln kommerziell hergestellte Partikel vergleichend gegenübergestellt.

2.1. Partikel und Herstellung

2.1.1. Generierung von Abriebprodukten im Partikelprüfstand

Die Generierung von Abriebpartikeln erfolgte durch die Simulation der Grenzfläche zwischen Hüftendoprothesenstiel und Knochenzement. Ermöglicht wurde dies mittels einer speziellen Vorrichtung (Partikelprüfstand) (Bader, Steinhäuser et al. 2004). Realitätsnah kann hier der Zustand eines im Zementköcher gelockerten und reibenden Hüftendoprothesenstiels simuliert werden, indem nach vorausgegangener partieller distaler Stiel-Zementierung und anschließendem „Lockern“ der Grenzfläche zwischen Implantat und Knochenzement definierte Relativbewegungen appliziert werden.

Das gewählte Prüfmodell (Abbildung 4) ist gekennzeichnet durch einen modularen Aufbau. Zementköcher und Endoprothesenstiel sind in separaten Einspannvorrichtungen fixiert. Über eine steuerbare Hydraulik lassen sich das Ausmaß der Relativbewegungen sowie der Anpressdruck regulieren.

Laut Literatur liegen die Mikrobewegungen im Interface Endoprothesenstiel-Zement zwischen 100 und 500µm (Mann, Bartel et al. 1991; Ramaniraka, Rakotomanana et al. 2000). Für den weggeregelten Bewegungszylinder wurden eine Amplitude von 500µm sowie eine Frequenz von 5Hz gewählt. Unter trockenen Umgebungsbedingungen und einer Raumtemperatur von 25°C wurden drei Millionen

Lastzyklen in die Grenzfläche eingeleitet, was einer Belastung von drei Jahren in vivo entspricht.

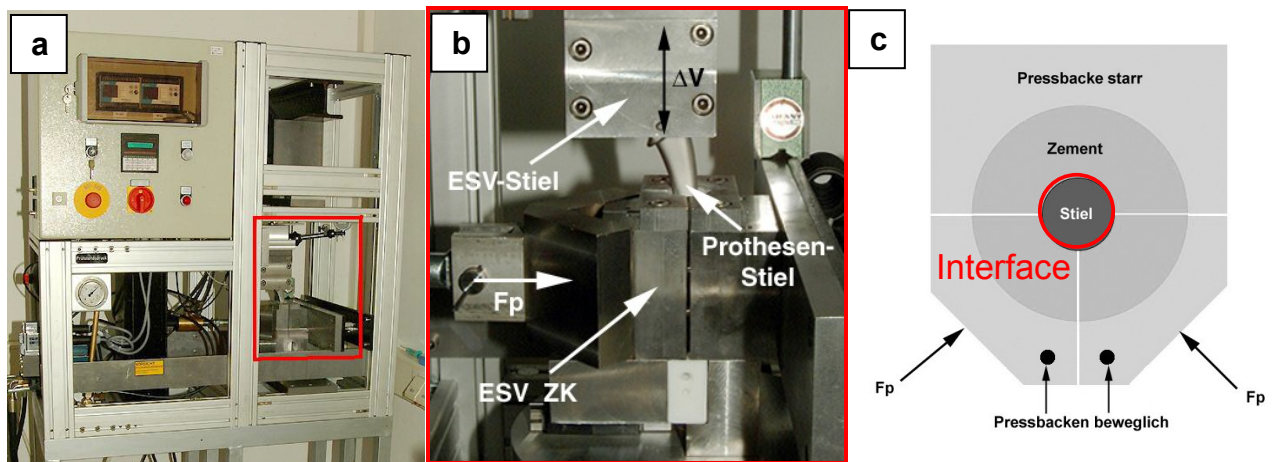


Abbildung 4:

- Partikelprüfstand zur Herstellung von Abriebpartikeln durch Simulation der Grenzfläche Hüftendoprothesenstiel und Knochenzement
- Detailvergrößerung aus (a): ESV-Stiel = Einspannvorrichtung für den Hüftendoprothesenstiel; ESV ZK = Einspannvorrichtung für den Zementköcher; F_p = Anpresskraft.
- Schematische Darstellung des Simulationsaufbaus. Aufbau einer konstanten Flächenpressung ($F_p=2\text{MPa}$) in der Grenzfläche Stiel-Zement über eine fixierte sowie zwei uni-axial drehbare Pressbacken.

Der Anpressdruck in der untersuchten Grenzfläche ist in der Literatur mit Werten von 2 bis maximal 7 MPa beschrieben (Mann, Bartel et al. 1991; Ramaniraka, Rakotomanana et al. 2000). Zur Gewährleistung einer konstanten Flächenpressung von 2 MPa bei bewegtem Stiel über die gesamte Versuchsdauer, erfolgte eine Unterteilung der Einspannvorrichtung für die Zementköcher in eine fixierte sowie zwei uni-axial drehbare Backen (Abbildung 4c).

Zur Herstellung der Zementköcher (Abbildung 5c) wurde für diese Arbeit ein handelsüblicher Knochenzement verwendet d.h. Polymethylmethacrylat (PMMA) Knochenzement mit 15% Zirkondioxid (Palacos R[®], Fa. Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland). Mit Hilfe einer Zementiervorrichtung aus Polytetrafluorethylen (PTFE) konnten für jede Stieltestung neue Zementköcher hergestellt werden. Entsprechend der Einspannvorrichtung wurden diese

anschließend in drei definierte Teilkörper unterteilt. Die Stiel-Zement-Fixierung erfolgte aus versuchstechnischen Gründen über das mittlere und distale Drittel des Stiels. Die als Resultat von konstanter Flächenpressung und Relativbewegung entstandenen Abriebprodukte wurden in einem speziellen Behälter aus Polytetrafluorethylen aufgefangen und im Anschluss weiteren Untersuchungen zugeführt. Zur Vermeidung einer Kontamination mit Fremdpartikeln wurde die Prüfvorrichtung entsprechend abgedeckt. Die Einspannvorrichtungen sowie das Auffangbehältnis wurden nach abgelaufenem Testzyklus eines Prüfkörpers mit Ethanol bzw. im Ultraschallbad gereinigt.

2.1.2. Prüfbjekte

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden anatomisch geformte zementierte Hüftendoprothesenstiele CAP-M (Peter Brehm Chirurgie Mechanik, Weisendorf, Deutschland) verwendet. Sämtliche Stiele waren geometrisch identisch. Unterschiede wurden durch Werkstoff- und Oberflächenmodifikationen hergestellt.

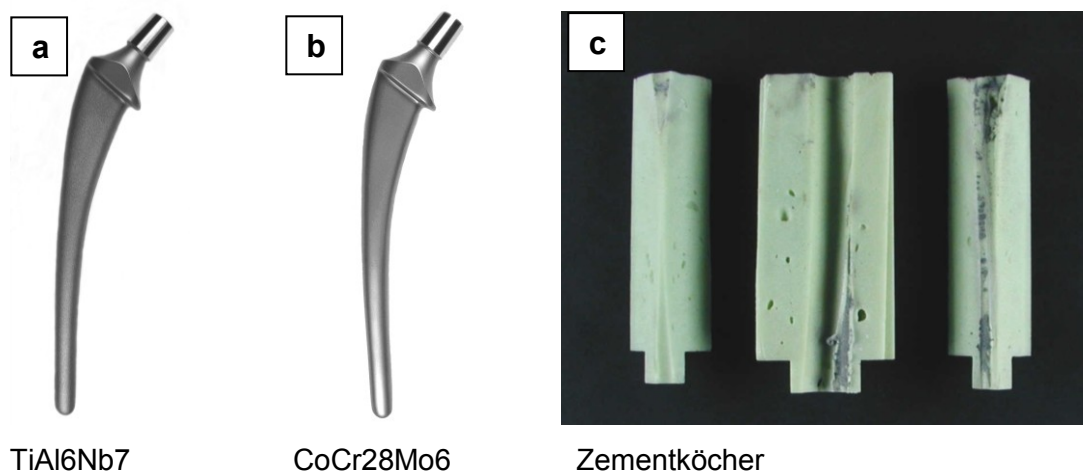


Abbildung 5:

- a) Anatomischer zementierter Hüftendoprothesenstiel CAP-M (Peter Brehm Chirurgie Mechanik, Weisendorf, Deutschland) TiAl6Nb7-Legierung
- b) Anatomischer zementierter Hüftendoprothesenstiel CAP-M (Peter Brehm Chirurgie Mechanik, Weisendorf, Deutschland) CoCr28Mo6-Legierung
- c) Dreiteiliger Zementköcher hergestellt aus Knochenzement mit 15% Zirkondioxid (Palacos R[®], Fa. Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland)

Zum Einsatz kamen in dieser Arbeit Legierungen aus TiAl6Nb7 und CoCr28Mo6. Die Titan-Stiele sind für den klinischen Einsatz nicht erhältlich und wurden daher als Sonderanfertigung geschmiedet. Die Stiele aus der CoCr28Mo6- Legierung hingegen sind handelsüblich. Modifizierte Oberflächen wurden durch die Oberflächenrauheit charakterisiert (Rz Wert).

Die Rauheit wurde durch eine im Vorfeld durchgeführte Kugelstrahlbehandlung (Korund und Glasperlen) hergestellt. Für beide Legierungen wurden sowohl glatte Oberflächen mit einem Rz Wert von 7µm, als auch raue mit einem Rz Wert von 20 µm gewählt.

Die Zementköcher wurden wie bereits oben beschrieben aus kommerziell erhältlichem Polymethylmethacrylat (PMMA) Knochenzement (Palacos® R, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) mit 15 % Zirkondioxid (ZrO₂) als Kontrastmittelzusatz hergestellt.

2.1.3. Kommerzielle Referenzpartikel

Für vergleichende zellbiologische Untersuchungen wurden zu den genannten experimentell hergestellten Abriebpartikeln auch kommerziell erhältliche Referenzpartikel verwendet. Neben Reintitanpartikeln mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 3 µm (cp-Ti; Grade E; Chemetall, Frankfurt, Deutschland) kamen reine polykristalline ZrO₂ Partikel mit einer durchschnittlichen Korngröße von 1,75 ± 4,66 µm (Selectipur, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) zum Einsatz.

2.2. Charakterisierung der Abriebprodukte

2.2.1. Quantitative Analyse

Die Abriebprodukte (Zement- und Metallpartikel) eines Prüfansatzes wurden über eine Testdauer von 3 Millionen Zyklen in dem PTFE-Behälter aufgefangen. Nach Abschluss wurden Endoprothesenstiel und Zement sowie der entstandene Abrieb makroskopisch begutachtet, um gröbere Auffälligkeiten dokumentieren zu können. Anschließend wurde das Abriebpulver der gravimetrischen Bestimmung zugeführt. Die Bestimmung des absoluten Gewichtes des Gesamtabriebes erfolgte mittels einer Präzisionswaage (BP210D, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland).

2.2.2. Bestimmung metallischen Abriebs in den nativen Destruktionsprodukten mittels Atomabsorptionsspektrometrie

Die nachfolgende Untersuchung mittels Atomabsorptionsspektrometrie wurde in Zusammenarbeit mit der Fachhochschule München (Fachbereich Feinwerk- und Mikrotechnik/Physikalische Technik, Prof. Dr. Winklmaier, Dipl.-Ing. Düttmann) durchgeführt. Die Atomabsorptionsspektrometrie wird standardmäßig zur Konzentrationsbestimmung chemischer Elemente angewendet und erlaubt einen Nachweis bis in den Spurenbereich (untere Nachweisgrenze bis ng/l). Durch die Absorption ultravioletten bzw. sichtbaren Lichtes angeregter Atome lassen sich aufgrund spezifischer Wellenlängen der Elemente Rückschlüsse auf die Zusammensetzung verschieden Materialien gewinnen (Salvati, Betts et al. 1993).

Diese Eigenschaft wurde in diesem Zusammenhang genutzt, um den Metallgehalt des Abriebs zu messen. Damit sollen zum einen Aussagen bezüglich des Einflusses von Oberflächenrauheit und Werkstoff auf den Anteil metallischen Abriebs, zum anderen zu den Auswirkungen des Metallgehaltes der unterschiedlichen Legierungskomponenten auf den Metabolismus humaner Osteoblasten getroffen werden.

Das verwendete Atomabsorptionsspektrometer (Spectr AA 30/40 Zeeman, Varian, Darmstadt, Deutschland) (Abbildung 6) emittiert über eine Hohlkathodenlampe (gefüllt mit Titan respektive Kobalt) als Primärstrahlungsquelle nach Anlegen einer Hochspannung die elementtypische Strahlung. Zur Analyse der Probe wurde diese zunächst getrocknet und anschließend mittels eines elektrisch beheizten Graphitrohres atomisiert. Ein Monochromator konzentriert die Strahlung des gewünschten Wellenlängenbereiches, welche von einem Photomultiplier in ein elektrisches Signal umgewandelt werden.

Zur korrekten Metallgehaltbestimmung wurden im Vorfeld definierte Kalibrierlösungen hergestellt. Die Blanklösung bestand aus 1 ml einer 37 %igen Salzsäure, 3 g Glycerin und einem organischen Lösungsmittel (DMSO/DMF/Aceton). Die Titan- bzw. Kobalt-Standardlösungen entstanden durch hinzufügen von 10mg/l des jeweiligen Elementes. Die Glaskolben wurden mit Aqua destillata bis zur gewünschten Menge aufgefüllt und für 30 Minuten im Ultraschallbad behandelt. In Verbindung mit dem hinzugefügten Glycerin und der dadurch erhöhten Viskosität der Lösung konnten Sedimentationseffekte der Partikel reduziert werden. Aufgrund der im Vergleich etwas niedrigeren Verdampfungstemperatur von Kobalt war das Hinzugeben eines

Modifiers notwendig. Bestehend aus gleichen Teilen Palladium-(II)-chlorid (2g/l) und Hydroxylammoniumchlorid (100 g/l) erlaubt er eine höhere Veraschungstemperatur, was den Vorteil einer Signalverstärkung bietet.

Über ein Extrapolationsverfahren konnte dann anhand der ermittelten Eichgerade im Weiteren die Konzentration der Proben bestimmt werden.

Mittels Atomabsorptionsspektrometrie wurden die Abriebprodukte von vier verschiedenen Endoprothesenstielen mit unterschiedlichen Materialkompositionen und Oberflächenbeschaffenheiten auf ihren Metallgehalt hin untersucht. Aus jeweils drei Abriebtestungen wurde das Abriebmaterial von glatten ($n=3$) und rauen ($n=3$) TiAl6Nb7-Stielen sowie glatten CoCr28Mo6-Stielen ($n=3$) analysiert. Für raue CoCr28Mo6-Stiele ($n=2$) gingen zwei Testungen in das Analyseverfahren zum Metallabrieb ein.

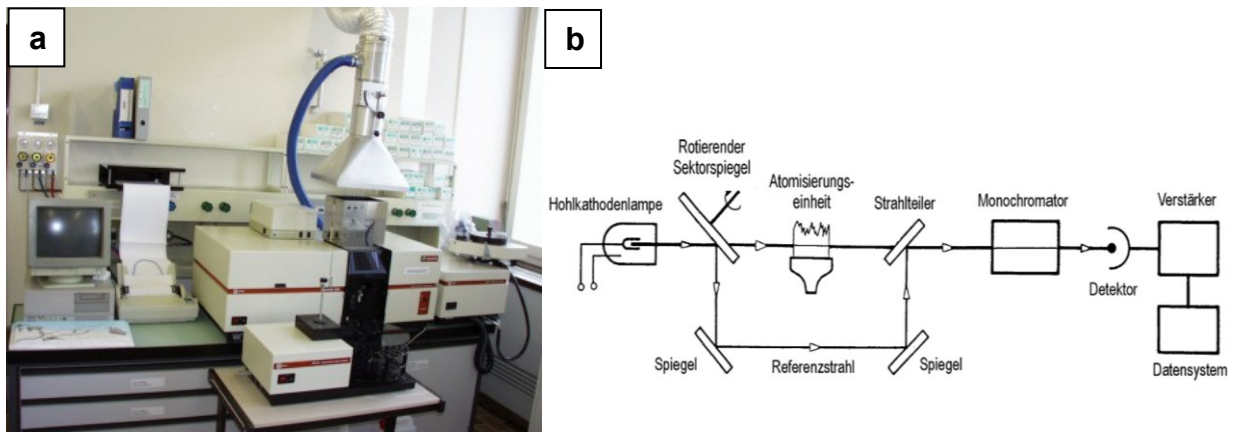


Abbildung 6:

- a) Arbeitsplatz mit verwendetem Atomabsorptionsspektrometer (Spectr AA 30/40 Zeeman, Varian, Darmstadt, Deutschland)
- b) Schemadarstellung zum Aufbau eines Atomabsorptionsspektrometers

2.2.3. Bestimmung der Partikelgröße

Ein weiterer wichtiger Parameter für die Charakterisierung der verschiedenen generierten Abriebprodukte ist die durchschnittliche Partikelgröße, die anhand der Größenverteilungskurve aus dem Mastersizer 2000 (Malvern, Worcestershire, Großbritannien) bestimmt werden konnte (Abbildung 7). Die Analyse mittels Mastersizer stellt ein etabliertes Verfahren zur Größenbestimmung von Partikeln dar und wurde in Zusammenarbeit mit dem Zentralinstitut für Medizintechnik (ZIMT) der Technischen Universität München (Direktor: Prof. Dr. Wintermantel) durchgeführt.



Abbildung 7:
Mastersizer 2000 (Malvern,
Worcestershire, Großbritannien)
zur Bestimmung der
Partikelgröße

Auf der Basis der Laserbeugungstechnologie ermöglicht der Mastersizer 2000 die Partikelgrößenbestimmung in einem Bereich von $0,02\ \mu\text{m}$ bis zu $2000\ \mu\text{m}$ Partikeldurchmesser.

Durch eine bestimmte Anordnung von Photosensoren kann die Streuung eines Helium-Neon-Laserstrahls detektiert werden. Diese Streuung ist abhängig von der Größe der auf den Laserstrahl treffenden Partikel, welche das Laserlicht auf entsprechende Detektoren lenkt. Der Ablenkungswinkel des Lichtes ist umgekehrt proportional zur Partikelgröße. Über die Messung der einfallenden Lichtintensität kann dann eine genaue Angabe zur Größenverteilung erstellt werden.

Zur Unterstützung einer gleichmäßigen Partikelverteilung wurden die nativen generierten Abriebprodukte mit einigen Tropfen eines Detergenz (Brij[®]-35 Lösung, 35%, Sigma Diagnostics, St. Louis, Missouri, USA) zur Verringerung der Oberflächenspannung versetzt. Eine anschließende Behandlung der Suspension im Ultraschallbad diente zur Reduktion der Partikeladhärenz an der Gefäßwand vor Einbringen in die Messkapillare des Untersuchungsinstrumentes.

2.3. Präparation der Partikel für die zellbiologischen Untersuchungen

Für die nachfolgenden zellbiologischen Analysen wurden jeweils 5 mg des gesammelten Abriebes als auch der Kontrollpartikel in einem 5 ml-Schraubgefäß eingewogen und mittels Gamma-Bestrahlung gemäß der Verordnung EN552/ISO 11137 mit 25 kGy (Gamma Service, Radeberg, Deutschland) sterilisiert.

Anschließend wurden die Partikel in 0,5 ml steriler PBS-Lösung (phosphate-buffered saline solution, pH 7,4; 138 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄; Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Deutschland) suspendiert, wodurch eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml hergestellt wurde. Durch weitere Verdünnungen mit dem Kulturmedium ließen sich dann die verschiedenen Konzentrationsstufen für die späteren Versuchsreihen von 1,0 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,01 mg/ml herstellen.

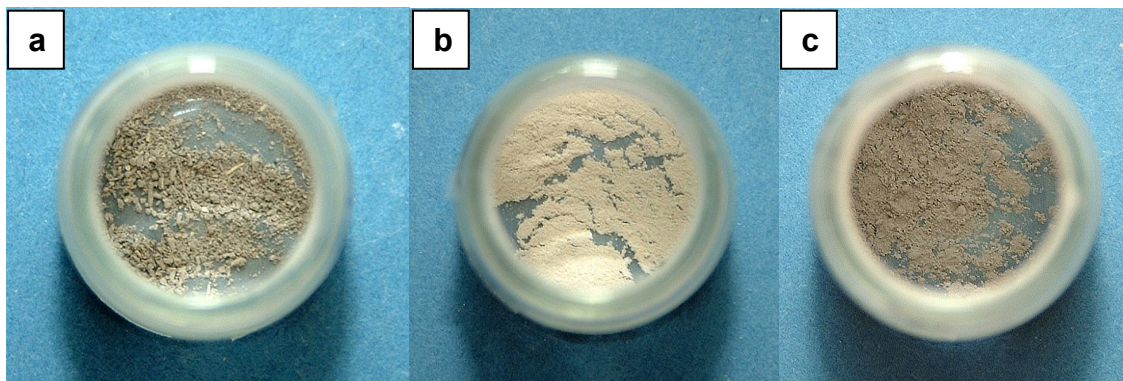


Abbildung 8:

- a) Abriebpartikel aus der Grenzfläche rauer TiAl6Nb7-Hüftendoprothesenstiel und Knochenzement mit 15% Zirkondioxid (Palacos R[®])
- b) Abriebpartikel aus der Grenzfläche glatter TiAl6Nb7-Hüftendoprothesenstiel und Knochenzement mit 15% Zirkondioxid (Palacos R[®])
- c) Abriebpartikel aus der Grenzfläche rauer CoCr28Mo6-Hüftendoprothesenstiel und Knochenzement mit 15% Zirkondioxid (Palacos R[®])

2.4. Zellbiologische Untersuchungen

2.4.1. Isolierung und Kultivierung humaner Osteoblasten

Mit dem Ziel einer realitätsnahen Abbildung der im Körper ablaufenden Prozesse im Rahmen einer partikelinduzierten aseptischen Lockerung wurden die folgenden zellbiologischen Untersuchungen mit primären humanen Knochenzellen durchgeführt.

Als Quelle zur Gewinnung primärer humaner Osteoblasten dienten explantierte Femurköpfe von Patienten, die sich einem primären Hüftgelenkersatz unterzogen. Die Patienten wurden vor dem Eingriff über die weitere Verwendung ihres biologischen Materials informiert. Voraussetzung für die Bereitstellung des Materials war eine unterschriebene Einverständniserklärung des Patienten. Ein positives Votum zu In-vitro-Untersuchungen an Knochenzellen wurde von der Ethikkommission der Universität Rostock am 27.08.2001 erteilt.

Der explantierte Femurkopf wurde direkt im Operationssaal in ein im Vorfeld sterilisiertes Glasgefäß gegeben und luftdicht verschlossen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Knochenmaterial in einem Kühlschrank (4-7 °C) aufbewahrt. Unter Aufrechterhaltung steriler Arbeitsbedingungen folgten die nächsten Arbeitsschritte in einer Laminar Flow Box (Steag, Reinraumtechnik, Pfullingen, Deutschland).

Mit einem scharfen Löffel wurde Spongiosa mit einem Volumen von etwa 4 ml extrahiert und in einem Probenröhrchen durch Hinzugeben von 20 ml PBS-Lösung suspendiert. Mehrfaches Schütteln und Austausch der Suspensionslösung dienten als Waschvorgang zur Separation von weiteren Bestandteilen wie Fett und Blut. Als Zeichen ausreichender Reinigung diente eine makroskopisch klare Lösung. In der Regel war dies nach zwei bis drei Waschritten der Fall.

Anschließend wurden jeweils 3 g Knochengewebe in 50 ml Teströhrchen (Cellstar®, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit 3 ml Collagenase A (Roche, Penzberg, Deutschland), 6 ml Dispase II (Roche, Penzberg, Deutschland) und 3 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biochrome AG, Berlin, Deutschland) inkubiert. Die Supplementierung von 1 % Penicillin und Streptomycin sowie 1 % Amphotericin B (jeweils von Gibco, Invitrogen-Gibco Cell Culture Products, Carlsbad, Kalifornien, USA) soll dabei einer möglichen bakteriellen Verunreinigung entgegenwirken. In einem speziellen Brutschrank mit konstanten

Umgebungsbedingungen von 37 °C und einer 5 % CO₂ Atmosphäre wurden die Proben unter kontinuierlicher Bewegung inkubiert.

Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden wurden die festeren Bestandteile mittels einer speziellen Filtervorrichtung (BD Biosciences, Bedford, USA) abfiltriert. Die dadurch gewonnene Zellsuspension wurde bei 900 U/min in den üblichen Teströhrchen für 10 Minuten zentrifugiert (Universal 32R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Nach Entfernung der Überstände erfolgte eine Resuspension des Zellpellets mit 8 ml DMEM Kulturmedium, supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS, Gibco, Invitrogen-Gibco Cell Culture Products, Carlsbad, Kalifornien, USA), 50 µg/ml L-Ascorbat-2-phosphat (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) und 10 mM β-Glycerophosphat (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Nun wurden die Zellen in Zellkulturflaschen (Nunc, Roskilde, Dänemark) ausgesät und bei 5 % CO₂ und 37 °C im Brutschrank kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 2 Tage gewechselt. Hierbei wurden nicht-adhärenente Zellen aspiriert und verworfen. Das Voranschreiten der Proliferation wurde durch mikroskopische Kontrollen verfolgt. Hierbei war das Verschmelzen der unterschiedlichen Proliferationsinseln ein entscheidendes Kriterium für die Reife der Kultur. Bei Erreichen eines konfluenten Stadiums (Abbildung 9), welches im Durchschnitt nach ca. zwei Wochen Kultivierung erreicht war, werden die gezüchteten Zellen aus den Kulturflaschen abgetragen und für die Lagerung in flüssigem Stickstoff vorbereitet.

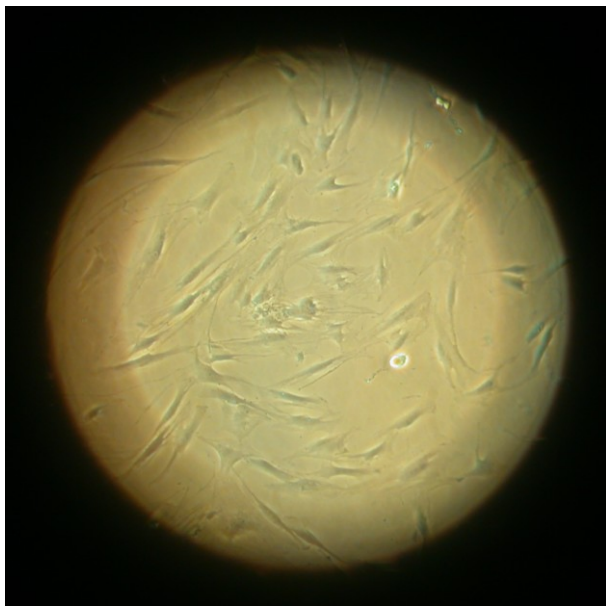


Abbildung 9:
Natives mikroskopisches Bild
(100fache Vergrößerung) einer
Kultur humaner Osteoblasten im
konfluenten Stadium

2.4.2. Zellkonservierung

Für die optimale zeitliche Abfolge der Partikelversuche war es notwendig, eine Möglichkeit zur Lagerung der kultivierten Zellen zu schaffen. Mit der Konservierung in flüssigem Stickstoff stand eine Methode zur Verfügung, die eine lange Haltbarkeit der Anzucht verspricht. Ein weiterer Vorteil bestand in der Möglichkeit der Poolbildung aus verschiedenen Zuchtansätzen, mit Verringerung des Einflusses individueller Zellcharakteristika auf die später erhobenen Daten und damit Erhöhung der Reproduzierbarkeit.

Zur Vorbereitung auf den Kryokonservierungsprozess mussten die in den Zellkulturflaschen adhärierenden Zellen abgelöst werden. Nach einem Waschschrift mit PBS wird zum Ablösen der Zellmatrix 0,5 %ige Trypsin-EDTA Lösung (Gibco, Invitrogen-Gibco Cell Culture Products, Carlsbad, Kalifornien, USA) verwendet. Die mit Trypsin versetzte Zellkulturflasche wurde für 3 Minuten unter humiden Bedingungen im Brutschrank inkubiert. Noch anhaftende Zellen konnten durch Beklopfen der Kulturflaschen in die Lösung überführt werden. Durch anschließendes Hinzugeben von 0,5 ml DMEM wurde der Vorgang des Ablösens unterbrochen. Die entstandene Suspension wurde in die üblichen Teströhrchen überführt und bei 900 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Im Vorfeld wurden zur Bestimmung der Zellzahl wenige Mikroliter der Suspension in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt. Durch entsprechende Multiplikation mit den verwendeten Volumina konnte auf die absolute Zellzahl geschlossen werden.

Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Überstände abpipettiert und verworfen. Das verbliebene Zellpellet wurde dann wieder in 1 ml Medium, welches 10 % Dimethylsulfoxid (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 90 % FBS enthielt, aufgelöst und in speziell zur Kryokonservierung vorgesehene Röhrchen gegeben (CryoTube™ Vials, Nunc, Roskilde, Dänemark).

Um ein gleichmäßiges Herunterkühlen von 1 °C/min zu gewährleisten, wurden die Röhrchen in einer Isopropanol enthaltenden Vorrichtung bei -70 °C über 24 Stunden gelagert (Qualilab, Nalgene, USA). Bis zur weiteren Verwendung für zellbiologische Untersuchungen wurde die Lagerung anschließend in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -139 °C fortgesetzt.

2.4.3. Immunhistochemie

Zellkulturen, die durch Anzucht aus humanem Knochenmaterial entstehen, weisen in der Regel einen heterogenen Charakter auf. So finden sich neben Osteoblasten auch Makrophagen und Fibroblasten. In Vorbereitung auf die Zellexperimente wurde nach Auftauen der Zellen das osteogene Potential der gewonnenen Zellen immunhistochemisch mittels eines Testkits zur alkalischen Phosphatase Färbung bestimmt (Cytomation, Dako, Carpinteria, Kalifornien, USA). Die alkalische Phosphatase (AP) kennzeichnet als typisches Marker-Protein den osteoblastischen Phänotyp und befindet sich bereits in der frühen Ausreifungsphase an der Zellmembran der Knochenzellen. Die im Knochen vorzufindende Isoform der alkalischen Phosphatase stellt den Initiator für die Kalzifizierung des Osteoids dar (Cowles, DeRome et al. 1998).

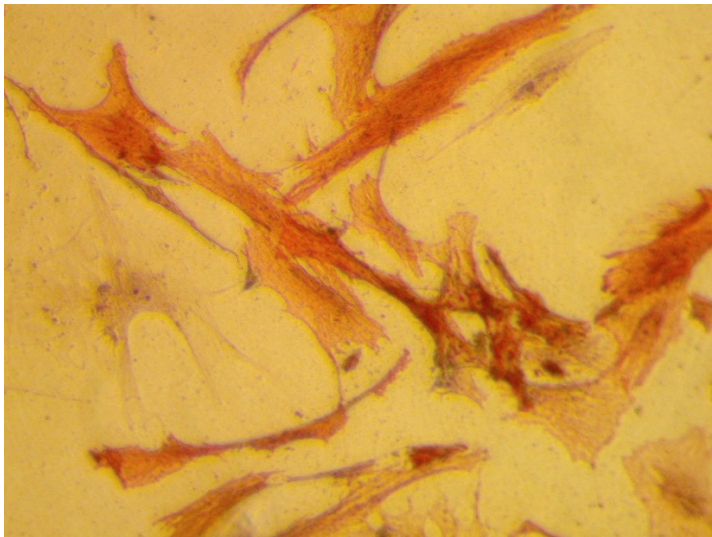


Abbildung 10:
Mikroskopische Aufnahme einer Kultur humaner Osteoblasten (400fache Vergrößerung) nach alkalischer Phosphatase-Färbung mit typischer Rotfärbung des osteoblastischen Phänotyps

Für die mikroskopische Untersuchung wurden die kultivierten Zellen in Suspension auf einen Objektträger gegeben. Zur Fixierung der Zellen auf dem Untergrund erfolgte zunächst das Hinzugeben von PBS dreimalig für je 5 Minuten. Im nächsten Schritt wurden Alkohol für 10 Minuten und zuletzt für 5 Minuten Tris-Puffer auf den Objektträger getropft. Nach 20 Minuten Lufttrocknung bei Raumtemperatur waren die Zellen fixiert, so dass die Färbelösung aufgetragen werden konnte. Inhalt der Lösung sind Fuchsin Chromogen, Fuchsin Activating Agent sowie ein Substratpuffer, die in einem aus dem Testkit stammenden speziellen Röhrchen zusammengegeben

wurden. Nach einer Einfärbzeit von mindestens 30 Minuten ließen sich die rot angefärbten Osteoblasten mikroskopisch nachweisen (Abbildung 10).

2.4.4. Inkubation humaner Knochenzellen mit Partikeln

Für die Hauptversuchsreihen wurden die Zellen mit nachweisbarem osteogenem Potential verwendet. Diese konnten dann in Abhängigkeit der aktuellen Verfügbarkeit zu den anstehenden Partikelversuchen entweder direkt aus der Anzucht in den Zellkulturflaschen oder aus der Kryokonservierung stammen.

Waren die Zellen direkt zu verwenden, so erfolgte das Ablösen der adhärierenden Zellen aus den Kulturflaschen wie bereits beschrieben mit 0,5 % Trypsin-EDTA. Die Zellen wurden nach Inaktivierung des Trypsins durch Beimengung von DMEM in bereits genannter Weise in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die nach dem Zentrifugieren verbliebenen Zellpellets wurden mit DMEM resuspendiert, so dass die gewünschte Zelldichte entstand. Anschließend wurden die Zellen auf 96 Well-Platten mit 3000 Zellen/well und 100 µl/well des oben beschriebenen Kulturmediums aufgebracht. Unter feuchtwarmen Bedingungen mit 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in der Umgebungsluft wurden die 96 Well-Platten im Brutschrank untergebracht. Nach 24 Stunden, in denen den im Medium enthaltenden Zellen eine Adhäsion ermöglicht wurde, wurde das partikelfreie Medium entfernt und durch Partikel enthaltendes Medium ersetzt, sowie anschließend über definierte Zeiträume inkubiert. Für jeden der nachfolgend untersuchten Zellparameter wurden mehrere Ansätze mit jeder Partikelentität in den Konzentrationsstufen 1,0 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,01 mg/ml durchgeführt.

2.4.5. Bestimmung des Zellüberlebens mittels MTT-Test

Als ein etabliertes Testverfahren zur Bestimmung des Zellüberlebens humaner Osteoblasten nach Kontakt mit verschiedenen Abriebpartikeln diente der MTT-Test (Fleury, Petit et al. 2006). Durch Umwandlung eines Markerreagenzes in aktiven Knochenzellen kann in einem photometrischen Verfahren indirekt auf die Menge lebensfähiger Zellen in einer Population rückgeschlossen werden. Als Markerreagenz dient das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-[4.5-Dimethylthiazol-2-yl]-2.5-Diphenyltetrazolium-Bromid), welches in rötliche Formazankristalle gespalten wird.

Nach einer Expositionszeit von 96 Stunden wurde das Partikel-enthaltende Medium aus den entsprechenden Wells entfernt. Aufgrund fehlerhafter Extinktionswerte bedingt durch agglomerierende Partikel insbesondere bei Ansätzen mit hoher Konzentration, wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren eine Waschung mit Entfernung des gesamten Partikelgehaltes initiiert.

Anschließend wurden die Zellen gemäß des Herstellerhinweises des verwendeten Kits (Cell Proliferation Kit I, Roche, Mannheim, Deutschland) mit 10 µl MTT-Reagenz gelöst in 100 µl DMEM über 4 Stunden in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37 °C inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden 100 µl einer "Marker-Lösung" für weitere 24 Stunden hinzugefügt. Das somit markierte MTT-Reagenz konnte dann im Anschluss durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm (Referenz bei 630 nm) quantifiziert werden (Opsys MR microplate reader, Dynex Technologies, Chantilly, Virginia, USA). Die Menge des absorbierten Lichtes korreliert dabei direkt mit dem Gehalt an Formazankristallen und damit gleichermaßen mit dem Zellüberleben.

2.4.6. Bestimmung der Synthesemenge von Prokollagen Typ I

Prokollagen Typ I ist als Marker, der Dysfunktionen in der ossären Synthese anzeigen kann, schon seit längerem bekannt (Simon, Krane et al. 1984). Somit konnte die Synthesemenge von Prokollagen Typ I als spezifischer Marker für die Reaktion knochenähnlicher Zellen gegenüber Abriebpartikeln angenommen werden. Die quantitative Analyse des von humanen Osteoblasten sezernierten Carboxy-terminalen Propeptids von Typ I Kollagen (CICP) wurde auf der Basis eines Sandwich-Immunoassays vollzogen. Dabei kamen spezifische monoklonale anti-CICP-Antikörper (Metra™ CICP EIA Kit, Quidel, Marburg, Deutschland) zur Anwendung. Die Probenentnahme erfolgte am 5. und 10. Tag. Anschließend wurden 25 µl jeder gesammelten Probe in einem Verhältnis von 1:12 verdünnt. Dann wurden 100 µl dieser Lösung auf Mikrotiter-Platten, beschichtet mit Kaninchen anti-CICP Antikörpern, verteilt. Nach 45 Minuten bei 20 °C und nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden je 100 µl eines aus Ziegen gewonnen Antikörpers gegen die bereits anhaftenden Antikörper hinzugegeben. Dieser war mit alkalischer Phosphatase konjugiert und wurde für 45 Minuten in den Wells belassen. Nach einer abschließenden Inkubation mit 100 µl eines Reagens über 30 Minuten konnte die

optische Dicht bei 405 nm gemessen werden. Anhand einer im Vorfeld erstellten Standardkurve konnten über die Absorptionswerte die tatsächlichen Mengen des synthetisierten Prokollagen Typ I in ng/ml ermittelt werden.

2.4.7. Analyse der Zytokin-Synthese

Die inflammatorische Aktivität humaner Osteoblasten hängt wie bereits erwähnt von der Synthese bestimmter Mediatoren ab. Um diese zu quantifizieren, wurden die Syntheseraten verschiedener Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA Tests (Bio-Plex Cytokine Assay, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA) bestimmt.

Dieser Test ermöglichte die gleichzeitige Analyse unterschiedlichster Zytokine in einem Well. Die Detektionsgrenze lag dabei bei > 5 ng/ml für jeden Analyten.

Fluorochrom-markierte Kügelchen im Submillimeterbereich waren dabei in der Lage selbst aus begrenzten Probenmengen komplette Zytokinprofile abzubilden. Gemäß Herstelleranweisung wurden je 50 μ l der Kulturüberstände auf 96 Well Platten verteilt. Jedes Well beinhaltete dabei je 2 μ l der Antikörper-markierten Kügelchen und 48 μ l Bio-Plex assay Pufferlösung, so dass ein Gesamtvolumen von je 100 μ l resultierte. Unter Belassung der Antikörper wurden die Wells dreimal mit PBS gewaschen und im Anschluss mit 25 μ l einer weiteren Antikörper-Lösung für 30 Minuten inkubiert. Um im Folgenden diese Bindungsreaktion messbar zu machen, wurde abschließend eine Lösung mit Streptavidin-Phycoerythrin (Bio-Rad) hinzu geführt. Dieses bindet an biotinylierte Areale gebundener Antikörper. Schließlich erfolgten ein weiterer Waschdurchgang und die Suspendierung der Antikörper-Kügelchen in der Puffer-Lösung (Bio-Rad). Basierend auf dem Prinzip der Messung fluorochrom-markierter Moleküle wurde jede Probe in einem speziellen Gerät (Luminex System, Austin, Texas, USA) untersucht. Über Standardkurven aus rekombinanten Zytokinen konnte über eine spezielle Bio-Plex Software die vorliegende Zytokin-Konzentration ermittelt werden.

2.5. Statistische Analyse

Die Daten der verschiedenen Zellexperimente wurden durch Varianzanalysen mittels Bonferroni post hoc Tests anhand der SPSS-Software, Version 14.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) verglichen. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert $<0,05$ angenommen. Für die graphische Darstellung wurden sowohl die Mittelwerte als auch die Standardabweichungen für die entsprechenden Partikelentitäten aufgetragen.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Partikelcharakterisierung

Die Gesamtmenge der freigesetzten Partikel (inklusive Knochenzement und metallischem Abrieb) zeigten insbesondere Unterschiede im Hinblick auf die Oberflächenbeschaffenheit (Tabelle 1). Unter identischen Abriebbedingungen generierten raue Stiele beträchtlich mehr Gesamtabrieb als Stiele mit glatter Oberfläche.

Die durchschnittlichen Mengen lagen dabei für TiAl6Nb7-Legierungen zwischen 98 mg bei rauen Stielen und 24 mg für glatte Stiele. Bei Endoprothesenstielen basierend auf Kobalt-Chrom-Legierungen lag die durchschnittliche Menge freigesetzter Partikel zwischen 131 mg mit rauer Oberfläche und 71 mg für glatte Äquivalente. Somit machte sich ebenfalls ein Unterschied in der Partikelmenge zwischen den unterschiedlichen Materialien und identischer Oberflächenrauheit der Stiele deutlich.

Tabelle 1: Abriebmenge und Metallkonzentration in Abrieb aus der Grenzfläche Hüftendoprothesenstiel (CAP-M mit TiAl6Nb7- bzw. CoCr28Mo6-Legierung) mit rauer bzw. glatter Oberfläche und PMMA-Knochenzement (Palacos® R).

Material- komposition und Oberflächen- beschaffenheit Endoprothesen- stiel	N	Abriebmenge gesamt	Konzentration metallischer Abrieb	Gesamtmenge metallischer Abrieb
TiAl6Nb7 Rau	3	98 ± 28 mg	5308 ± 2110 µg Ti/g	424 ± 93 µg Ti
TiAl6Nb7 Glatt	3	24 ± 4,0 mg	2393 ± 167 µg Ti/g	56 ± 8 µg Ti
CoCr28Mo6 Rau	2	131 ± 29 mg	5110 ± 234 µg Co/g	659 ± 120 µg Co
CoCr28Mo6 Glatt	3	71 ± 26 mg	4250 ± 750 µg Co/g	376 ± 83 µg Co

Es wurden durch Stiele mit rauen Oberflächen deutlich mehr Metallpartikel freigesetzt. Die höchste Konzentration metallischer Partikel wurde im Abriebmaterial der rauen TiAl6Nb7-Stiele gefunden. Die niedrigsten Mengen wurden indessen durch glatte TiAl6Nb7-Stiele generiert und zeigten einen signifikanten Unterschied zu den glatten CoCr28Mo6-Stielen. Im Gegensatz dazu variierte die Konzentration nicht-metallischer Partikel nur sehr gering und machte stets einen Anteil von über 99 % des Gesamtabriebs aus.

In der morphologischen Analyse mittels Mastersizer 2000 konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Größenverteilung der Abriebpartikel zwischen den Legierungen und Oberflächenbeschaffenheiten registriert werden. Die mittlere Größe lag zwischen 2,8 µm und 4,4 µm. Über 90 % aller Partikel waren kleiner als 13 µm (Tabelle 2). Dieses findet Ausdruck im d(0,9)-Wert.

Tabelle 2: Größenverteilung der Abriebpartikel aus der Grenzfläche Hüftendoprothesenstiel (CAP-M mit TiAl6Nb7- bzw. CoCr28Mo6-Legierung) mit rauer bzw. glatter Oberfläche und PMMA-Knochenzement (Palacos® R) bestimmt im Mastersizer 2000. (d(x) entspricht der Perzentile)

Material- komposition und Oberflächen- beschaffenheit Endoprothesen- stiel	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)
TiAl6Nb7 Rau	1,261 µm	3,467 µm	12,131 µm
TiAl6Nb7 Glatt	1,286 µm	4,442 µm	33,589 µm
CoCr28Mo6 Rau	1,048 µm	3,248 µm	12,952 µm
CoCr28Mo6 Glatt	1,146 µm	2,815 µm	15,123 µm

3.2. Einfluss verschiedener Partikel auf das Zellüberleben humaner Osteoblasten

Die Hauptaussage des MTT-Tests ist die Dosis-abhängige Beeinflussung des Zellüberlebens humaner Osteoblasten bei allen Partikelentitäten. Das Zellüberleben wurde signifikant durch Abriebpartikel aus den Abriebversuchen mit rauen und glatten CoCr28Mo6-Stielen beeinflusst. Gleichermäßen wurden die Zellen durch die Exposition gegenüber Reintitan-Partikel in ihrem Zellüberleben gehemmt. Dieser Einfluss wurde noch markanter durch die Verwendung hoher Konzentrationen (Abbildung 11). Im Gegensatz dazu hatte das Vorhandensein von Zirkondioxidpartikeln keinen signifikanten Effekt. Tatsächlich war sogar ein Verbleiben auf Ausgangsniveau zu verzeichnen, wenn ZrO_2 in Konzentrationen von 0,01 und 0,1 mg/ml eingesetzt wurde. Die Extinktionswerte waren vergleichbar mit denen Partikel-freier Ansätze.

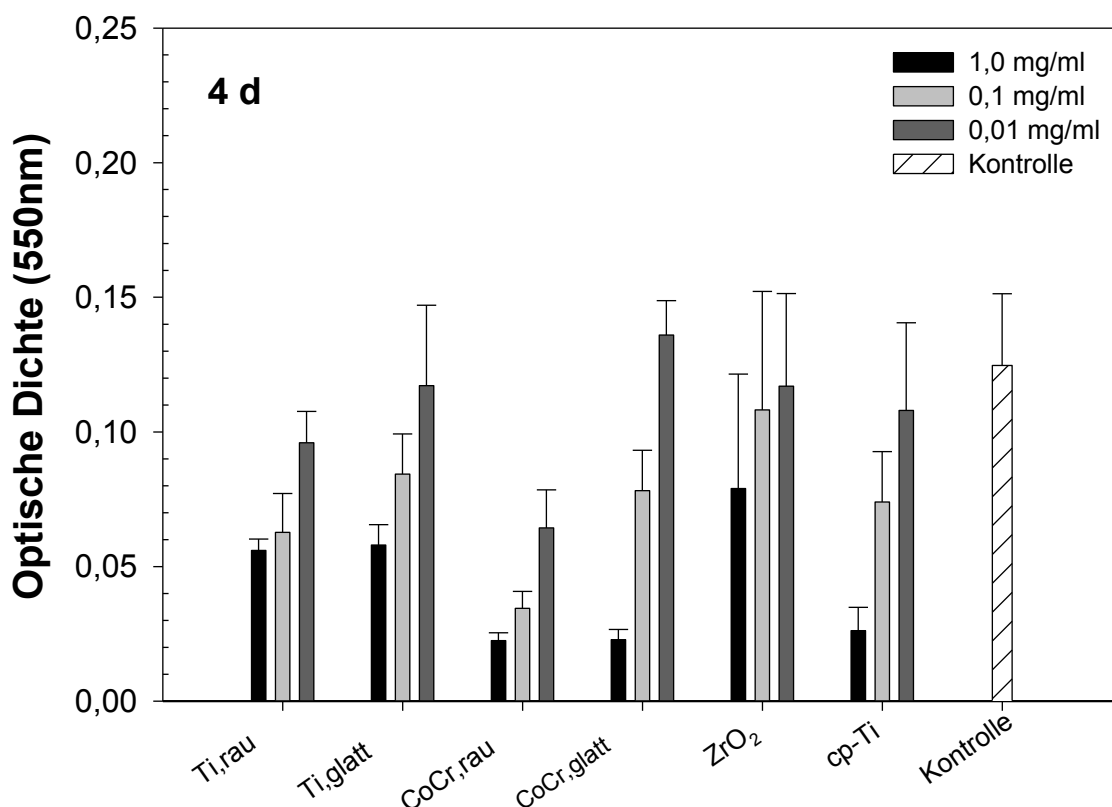


Abbildung 11: Einfluss unterschiedlicher Partikeltypen in definierten Konzentrationen (1,0 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,01 mg/ml) auf das Zellüberleben humaner Osteoblasten dargestellt durch die optische Dichte im MTT-Test nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen.

Ein Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit konnte nur beim Einsatz niedriger Partikel-Konzentrationen beobachtet werden. Besonders Partikel rau gestrahlter Kobalt-Chrom-Stiele führten zu einem statistisch signifikanten größeren Verlust vitaler Knochenzellen.

Im Vergleich zu den Kobalt-Chrom-Legierungen verringerten die Partikel aus den Tests mit zementierten TiAl6Nb7-Stielen die Zellviabilität nicht in diesem Ausmaß. Jedoch konnte dieser Effekt nicht mit einer statistischen Signifikanz untermauert werden, so dass derzeit nur von einem Trend gesprochen werden kann.

3.3. Einfluss verschiedener Partikel auf die Prokollagen Typ I Synthese

Dieser Versuch zeigt eindeutige Trends eines konzentrationsabhängigen Verhaltens der Synthese des Carboxy-terminalen Propeptids des Typ I Kollagens (CICP) gegenüber verschiedenen Partikeltypen auf (Abbildung 12). Dieser charakterisiert damit die negative Beeinflussung der Proteinsynthese humaner Osteoblasten durch Abriebpartikel.

Dieser Effekt war am eindrucklichsten für die Exposition mit cp-Ti sowohl nach 5 (Abbildung 12A) als auch 10 Tagen (Abbildung 12B). Aber auch ZrO_2 zeigte vergleichbare Tendenzen, jedoch mit einer weitaus größeren Variationsbreite. Es konnte eine statistisch signifikante Verringerung der Freisetzung von CICP für hohe Konzentrationen verzeichnet werden. Für niedrige Konzentrationen konnten jedoch im Gegensatz dazu stimulative Effekte aufgezeigt werden.

Keine Unterschiede wurden zwischen den Partikeln rauer und glatter Titanstiele gefunden. Ganz im Gegensatz dazu stellte sich eine signifikante Negativbeeinflussung über alle Konzentrationsstufen nach Exposition mit Partikeln von rauen CoCr28Mo6-Stielen dar. Hier kam es bereits bei niedrigen Konzentrationen zu einer Inhibierung der CICP-Synthese. Zwischen den übrigen getesteten Partikeln konnten keine statistischen Unterschiede gefunden werden.

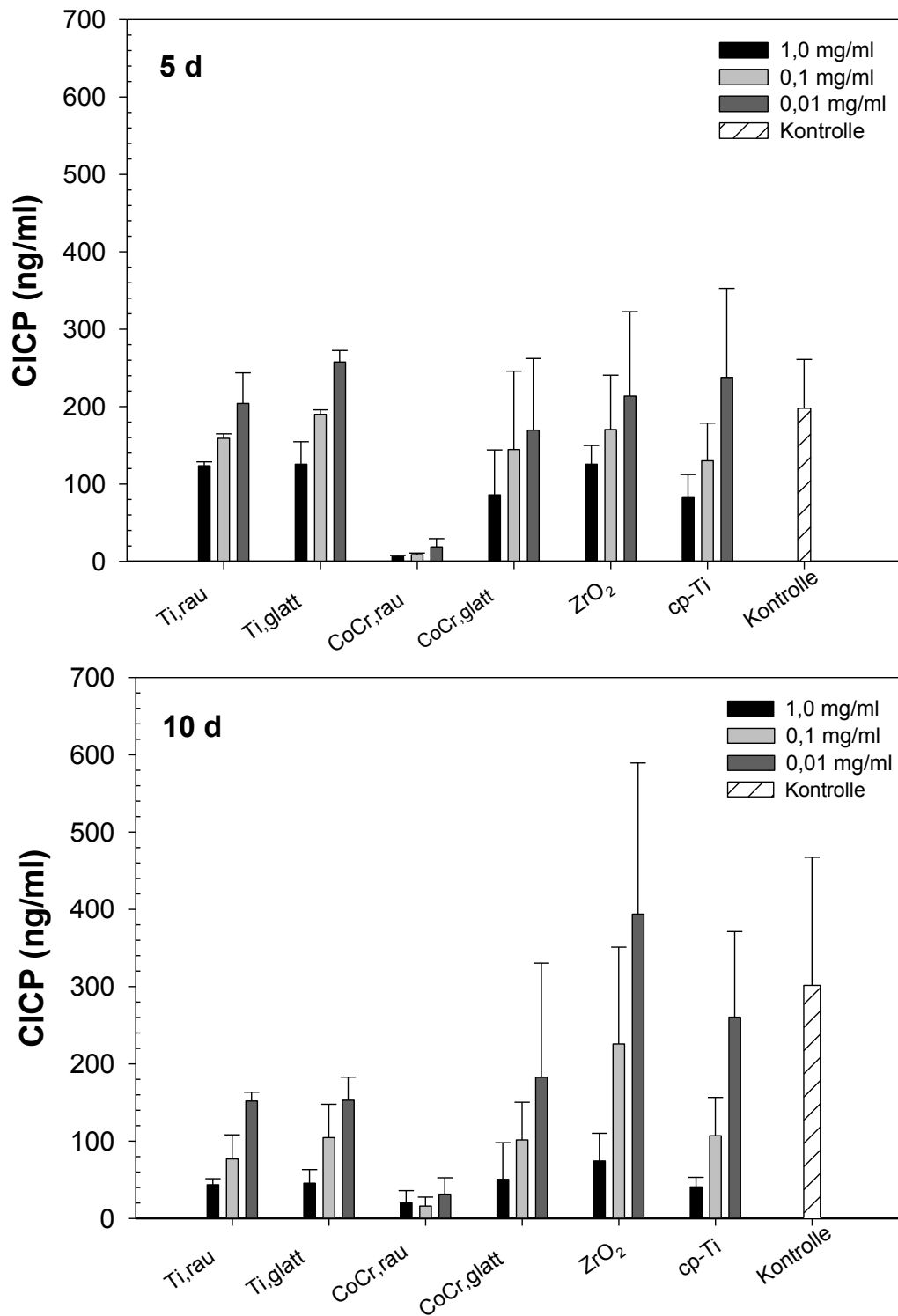


Abbildung 12: Einfluss unterschiedlicher Partikeltypen in definierten Konzentrationen (1,0 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,01 mg/ml) auf die Synthese des Carboxy-terminalen Propeptids des Typ I Kollagens (CICP) humaner Osteoblasten in ng/ml nach einer Inkubationszeit von 5 bzw. 10 Tagen

3.4. Einfluss verschiedener Partikel auf die Zytokin-Produktion

Die Analyse der Zytokin-Produktion erlaubt Aussagen über die Mediatoren, die für die Induktion osteolytischer Prozesse verantwortlich sind. Diese zeigte analog zu den anderen bestimmten Zellparametern eine Konzentrationsabhängigkeit der Partikel (Abbildung 13). Im Fall von IL-6 konnte eine partikelinduzierte Modifizierung der Sekretion nach 4 Tagen Inkubation mit Abriebpartikeln demonstriert werden, jedoch ohne statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Partikelentitäten.

Nach 9 Tagen zeigte die IL-6-Synthese nach Exposition gegenüber ZrO_2 -Partikeln keine Abhängigkeit der Konzentration und spiegelte eine leichte nicht signifikante Stimulation im Vergleich zu den Kontrollwerten ohne Partikel wider. Im Gegensatz dazu exprimierten die Zellen nach Inkubation mit den anderen Materialien 10 bis 12-fach weniger IL-6 bei der Maximalkonzentration von 1,0 mg/ml.

Interessanterweise kam es besonders bei Partikeln rauer TiAl6Nb7-Stiele und Reintitan-Partikeln zu einer vermehrten IL-6-Produktion. Wenngleich ohne statistische Signifikanz konnte dennoch fast eine Verdopplung der Synthese im Vergleich zu partikelfreien Ansätzen nachgewiesen werden. Alle Partikelentitäten präsentierten weder signifikante Synthesehemmungen noch stimulative Effekte auf die Expression von IL-8 (Abbildung 14). Es zeigte sich lediglich eine diskrete Steigerung nach Stimulation mit Partikeln aus den Abriebversuchen glatter TiAl6Nb7-Stiele nach 4 Tagen. Dieser Effekt verlor sich jedoch nach 9 Tagen. Den höchsten Ausschlag markierte die Exposition von rauen TiAl6Nb7-Partikeln bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml und betrug etwa das Doppelte des Kontrollwertes. In der Gesamtschau wurden die Maximalwerte am vierten Tag gefunden und waren generell durch niedrige Konzentrationen von 0,1 mg/ml hervorgerufen worden.

Die Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$ konnte nicht analysiert werden, da die exprimierten Mengen sowohl am vierten als auch neunten Tag unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

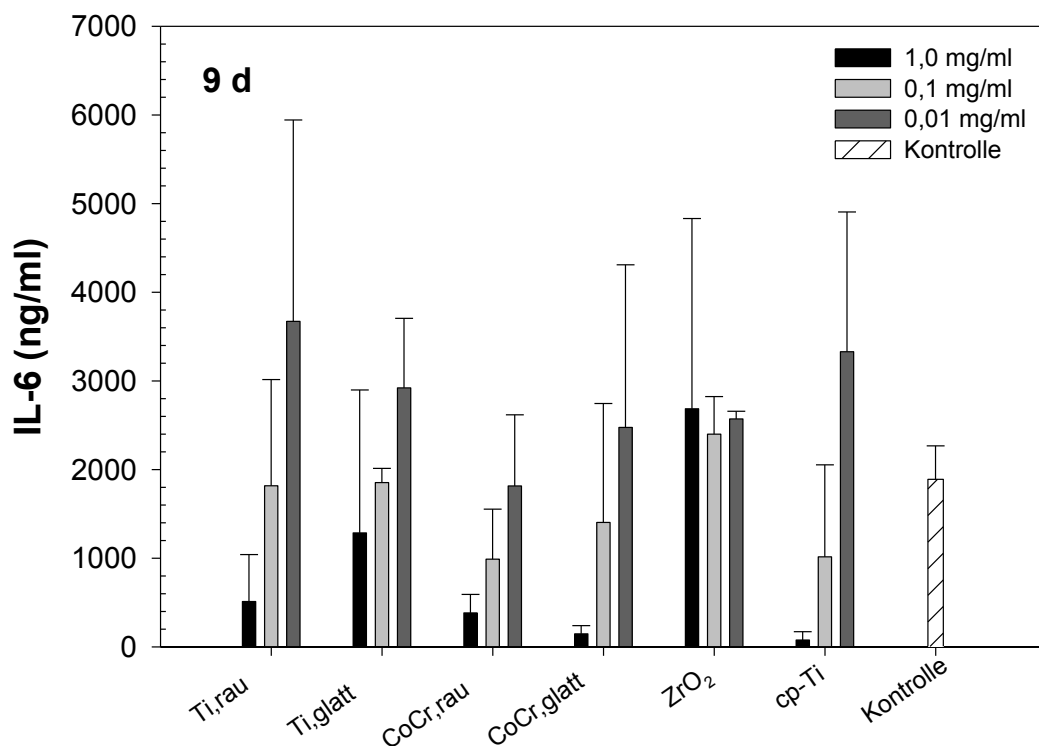
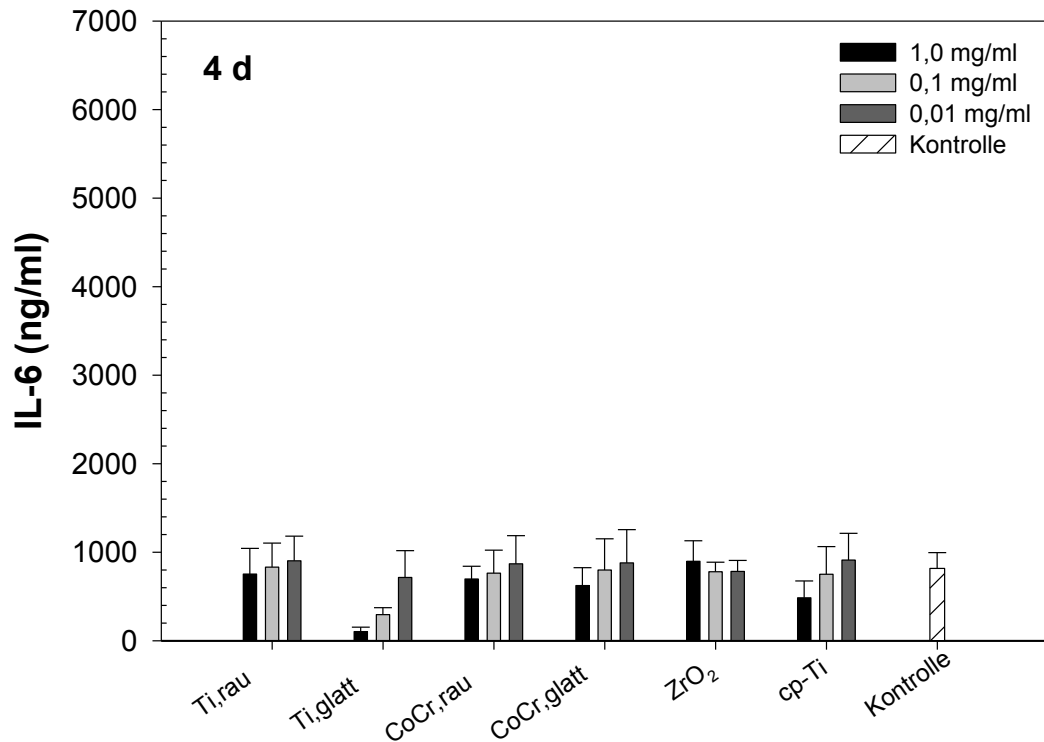


Abbildung 13: Einfluss unterschiedlicher Partikeltypen in definierten Konzentrationen (1,0 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,01 mg/ml) auf die Synthese von Interleukin-6 (IL-6) humaner Osteoblasten in ng/ml nach einer Inkubationszeit von 4 bzw. 9 Tagen.

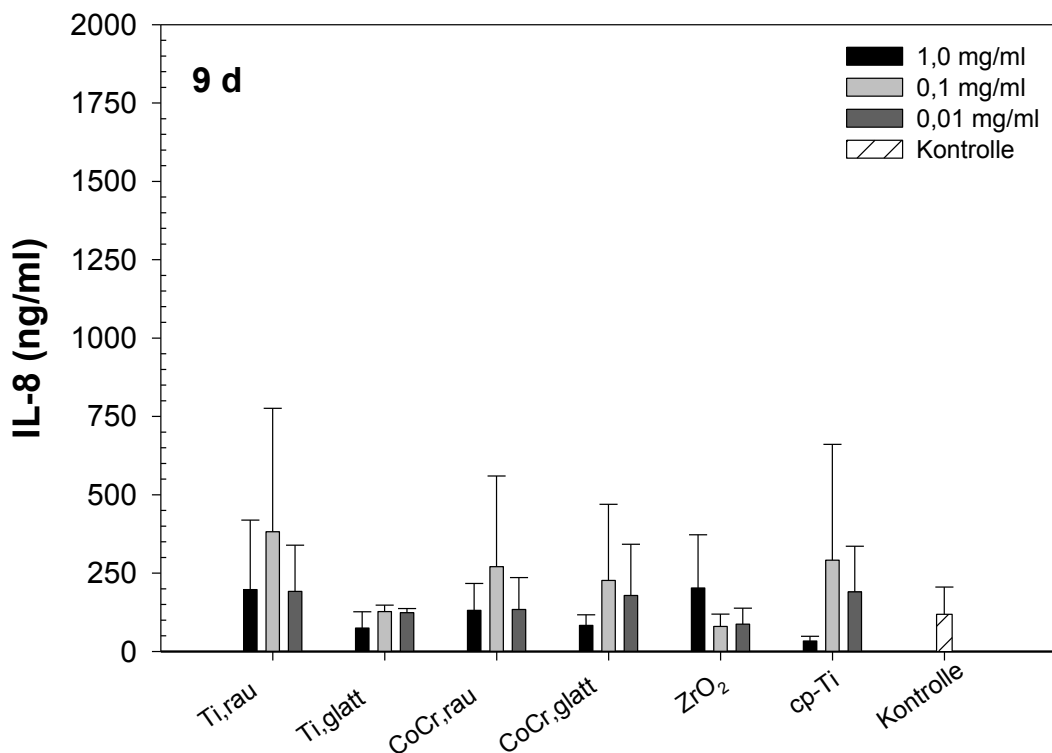
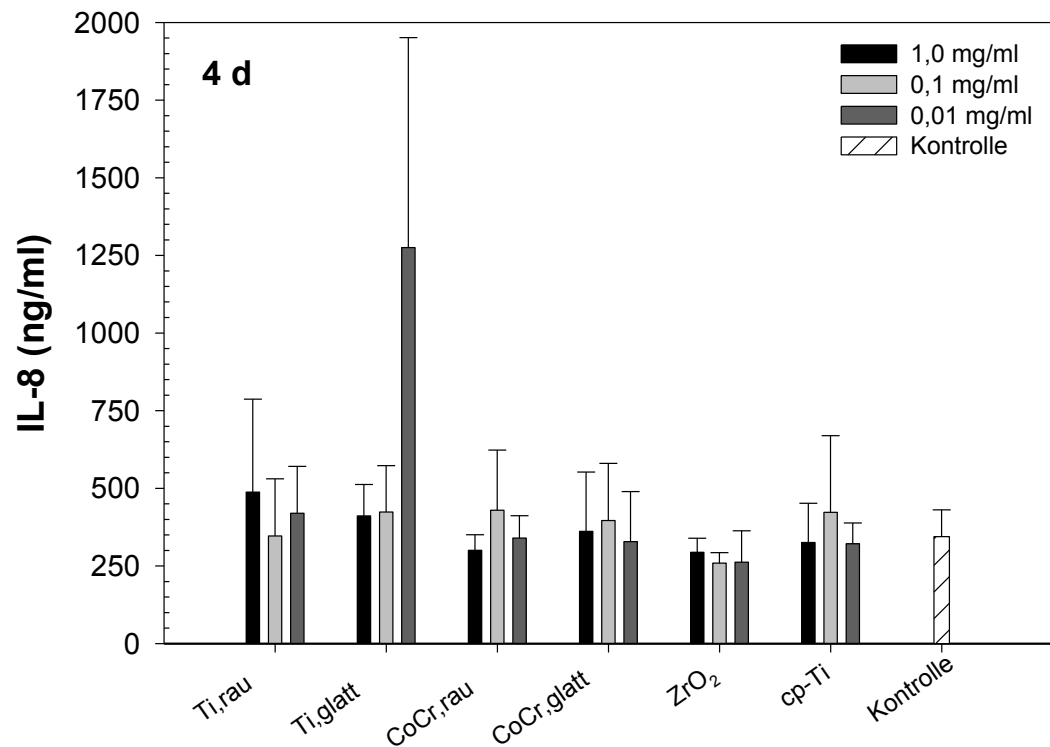


Abbildung 14: Einfluss unterschiedlicher Partikeltypen in definierten Konzentrationen (1,0 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,01 mg/ml) auf die Synthese von Interleukin-8 (IL-8) humaner Osteoblasten in ng/ml nach einer Inkubationszeit von 4 bzw. 9 Tagen.

4. Diskussion

In der Literatur finden sich zahlreiche Studien, die sich mit der Thematik der aseptischen Implantatlockerung beschäftigen und zum Teil detaillierte Konzepte zur Pathogenese beschreiben (Santavirta, Xu et al. 1998; Gallo, Kamínek et al. 2002; Purdue, Koulouvaris et al. 2007). Als zentrales Element der frühen Hüftendoprothesenlockerung gelten freigesetzte Abriebpartikel (Willert et Semlitsch 1976). Diese Partikel können verschiedenen Ursprungs sein und werden überwiegend durch mechanischen Verschleiß insbesondere an Grenzflächen des Implantates generiert bzw. freigesetzt. Die Folge ist eine Alteration verschiedener Zelltypen in der unmittelbaren Implantatumgebung, was zu einer von Willert et al. beschriebenen Fremdkörperreaktion führt (Willert et Semlitsch 1977). Das schwärzliche Granulationsgewebe, welches sich im Rahmen von Wechseloperationen findet, gibt Grund zur Annahme, dass insbesondere metallische Partikel Einfluss auf das Ausmaß der aseptischen Lockerung nehmen. Unterstützt wird dieser Verdacht durch histologische Untersuchungen des periprothetischen Gewebes. Hier wurden bereits nach kurzen Standzeiten bereits zum Teil beträchtliche Mengen an Metallionen nachgewiesen. Agins et al. untersuchten das periprothetische Gewebe gelockerter Hüftendoprothesen zementierter und nicht zementierter Stiele aus Titan-Legierungen und ermittelten bei im Mittel nach 33,5 Monaten gewechselten Hüftendoprothesenstielen Titanmengen bis zu 3700 µg pro Gramm getrockneten periprothetischen Gewebes (Agins, Alcock et al. 1988). Die Analysen der Abriebpartikel zeigten eine durchschnittliche Partikelgröße von 0,2 bis 7 µm, die es den Zellen erleichtert, diese zu phagozytieren (Pioletti, Takei et al. 1999; Ingham, Green et al. 2000). Doch ist es den Zellen nicht möglich die anorganischen Substanzen zu eliminieren, so dass diese im Gewebe akkumulieren. Umfangreiche Literatur beschreibt dabei die zentrale Rolle der Makrophagen, welche eine Kaskade inflammatorischer Zellmediatoren in das Gewebe abgeben und dadurch osteolytische Prozesse initiieren (Ingham, Green et al. 2000; Petit, Catelas et al. 2002). Wesentliche Erkenntnisse wurden dabei durch Untersuchungen von Kapselgewebe gewonnen, welches durch Abriebprozesse in der Artikulationsfläche zwischen Gelenkpfanne und Prothesenkopf als erstes in Kontakt mit Abriebpartikeln gerät (Petit, Catelas et al. 2002). Hier finden sich gehäuft Polyethylenpartikel (Goodman,

Lind et al. 1998). Je nach verwendetem Gelenkpartner konnten auch metallische Partikel nachgewiesen werden (Willert et Semlitsch 1976).

Andere Autoren beziehen ihre Aussagen auf experimentelle Studien, in denen meist kommerziell erhältliche Partikel zum Einsatz kommen (Howie, Rogers et al. 1996; Bi, Van De Motter et al. 2001). Diese Arbeitsgruppen beschreiben jedoch meist nur Endzustände der aseptischen Implantatlockerung und hinterlassen Fragen bezüglich pathogenetischer Details. Sicher erscheint, dass die Reduktion des Abriebs das Risiko einer aseptischen Lockerung minimiert. Als mögliche Einflussfaktoren auf das Abriebverhalten wurden anhand klinischer Studien unter anderem Werkstoff, Oberflächenverarbeitung und Implantatdesign postuliert (Bischoff, Freeman et al. 1994; Breusch, Schneider et al. 2000; Bader, Scholz et al. 2004).

Aufgrund seiner positiven Werkstoffeigenschaften wie hohe Biokompatibilität und Korrosionsbeständigkeit kommt Titan häufig in der Medizin zum Einsatz (Long et Rack 1998). Dennoch zeigten vor allem zementierte Endoprothesenstiele mit rauer Oberfläche aus Titan im Gegensatz zu vergleichbaren Stielen aus Kobalt-Chrom-Legierungen gehäuft hohe Abriebbelastungen im periprothetischen Gewebe mit der Folge einer frühen aseptischen Implantatlockerung (Tompkins, Lachiewicz et al. 1994; Willert, Brobäck et al. 1996). So ist gegenwärtig der Einsatz zementierter Endoprothesenstiele aus Titan-Legierungen umstritten. Die Lockerungsraten dieser Endoprothesen liegen je nach Studie zwischen 0 und 46 % (Eingartner, Volkmann et al. 2001). Besonders auffallend waren vor allem die häufigen Frühlockerungen einiger Titan-Stiele nach zwei bis drei Jahren von deutlich über 20 % (Massoud, Hunter et al. 1997; Lichtinger, Schürmann et al. 2000).

Durch differenziertere Betrachtungen ergaben sich jedoch neue Erkenntnisse. Allerdings sind diese Ergebnisse insgesamt schwierig zu interpretieren, denn die Verwendung unterschiedlichen Stiel designs mindert die Vergleichbarkeit der durchgeführten Studien. So konnte beispielsweise durch Bowditch et al. gezeigt werden, dass Geradschäfte aus Titanlegierungen Standzeiten von 10 Jahren bei etwa 95,4 % der Patienten erreichen konnten (Bowditch et Villar 2001). In den Untersuchungen von Hinrichs et al. zu einem zementierten feingestrahnten Hüftendoprothesenstiel aus Titan-Aluminium-Vanadium konnten ebenfalls vergleichsweise positive Ergebnisse dargestellt werden. Nach einem Nachuntersuchungszeitraum von durchschnittlich etwa 11 Jahren war bei nur 1,6 % der Patienten eine Wechsel-Operation aufgrund einer aseptischen Lockerung

notwendig geworden (Hinrichs, Boudriot et al. 2000). Auch Lichtinger et al. konnten in ihrer Studie nachweisen, dass Endoprothesenstiele aus Titan-Legierungen durch eine Oberflächenmodifikation mit einer Minderung der Rauheit gute Langzeitresultate aufweisen können. Durch die Generierung abriebbeständiger Oberflächen und damit Reduktion des pathogenetisch bedeutsamen Metallabriebs konnten ebenfalls 10-Jahres-Standzeiten von 95,4 % dokumentiert werden.

Den Einfluss der Oberfläche unterstreichen auch deutlich höheren Lockerungsraten zementierter Hüftendoprothesenstiele aus Kobalt-Chrom mit aufgerauter Oberfläche im Vergleich zu Stielen gleichen Designs mit glatter Oberfläche (Collis et Mohler 2002). Auch zementierte Exeter-Stiele aus glatt-poliertem Edelstahl waren nach aufrauender Oberflächenmodifikation mit einer höheren Rate aseptischer Lockerungen verbunden (Howie, Middleton et al. 1998). Damit kann der Werkstoff nicht allein für das Frühversagen einer zementierten Hüftendoprothese verantwortlich sein.

Die Widerstandsfähigkeit einer Endoprothese gegenüber Reibkorrosion vermindert sich mit zunehmender Steifigkeit. Diese ist ein Produkt des Elastizitätsmoduls des verwendeten Werkstoffes und der Geometrie des Stiels (Rader, Hendrich et al. 2000). Daher wird als eine wesentliche Ursache der abweichenden Literaturergebnisse insbesondere das Stieldesign diskutiert. Schöll et al. stellten fest, dass kleine zementierte Stiele aus einer Titanlegierung mit unbefriedigenden Ergebnissen verknüpft sind (Schöll, Eggli et al. 2000). Rader et al. forderten daher die Implantation eines möglichst großen Endoprothesenstiels. Dadurch verteile sich das auf der Endoprothese lastende Körpergewicht auf einer möglichst großen Stieloberfläche (Rader, Hendrich et al. 2000). Außerdem führe der niedrige Elastizitätsmodul bei kleinen Stielen zu einer Vermehrung der Mikrobewegungen und Spaltkorrosion wie bereits von Willert et al. beschrieben (Willert, Brobäck et al. 1996). Als Folge können Abriebpartikel durch Spaltbrüche im Zementmantel aus dem Interface von Endoprothesenstiel und Knochenzement in das periprothetische Gewebe gelangen und dort die Entzündungskaskade mit Schwächung des Implantat tragenden Knochens in Gang setzen (Willert, Brobäck et al. 1996).

Demgegenüber konnten klinische und histologische Untersuchungen zeigen, dass auch die Dicke des Zementmantels einer zementierten Hüftendoprothese bedeutsam für das Erreichen guter klinischer Ergebnisse ist. Unter einer Zementmanteldicke von 2-3 mm erhöht sich die Wahrscheinlichkeit von Zementbrüchen laut Breusch et al.

deutlich (Breusch, Schneider et al. 2000). Des Weiteren erhöht sich das Ausmaß der Schwingungen des Endoprothesenstiels mit der Induktion von Mikrobewegungen am Stiel-Zement-Interface, was wiederum zu vermehrtem Abrieb führt. In Kombination mit Werkstoffen, die dazu einen vergleichsweise niedrigen Elastizitätsmodul aufweisen, wie zum Beispiel Titan, potenziert sich das Schwingen und die damit verbundenen Mikrobewegungen.

Die uneinheitliche Datenlage bezüglich zementierter Titan-Stiele führte aus Mangel an klaren Erkenntnissen zum Zusammenspiel der einzelnen Faktoren zu Einschränkungen im klinischen Einsatz. Gegenwärtig finden hauptsächlich Kobalt-Chrom-Legierungen und rostfreie Edelstähle Verwendung als Werkstoff zementierter Hüftendoprothesenstiele. Diese Materialien zeigen in der aktuellen Literatur keine derartigen Frühlockerungsraten. Vergleichende klinische Studien fehlen jedoch.

Die Evaluierung einzelner Implantateigenschaften und deren Einfluss auf die aseptische Lockerung sind daher Gegenstand der Forschung. Hierbei ist ein reproduzierbarer In-vitro-Ansatz, mit der Möglichkeit verschiedene Endoprothesenstiele und ihre Merkmale unter gleichen Bedingungen zu testen, zu fordern. Hierdurch können die für den Abrieb günstigen Eigenschaften, insbesondere hinsichtlich Werkstoff und Oberflächenverarbeitung, herausgearbeitet werden, um somit generelle Empfehlungen für zukünftige Herstellungsverfahren ableiten zu können. Mit dem Vergleich von zementierten Hüftendoprothesenstielen auf Titan- sowie Kobalt-Chrom-Basis soll in der vorliegenden Arbeit die Frage geklärt werden, worin sich der mechanische Abrieb und sein Einfluss auf das umgebende Gewebe dieser Legierungen im Hinblick auf eine Veränderung der Stieloberfläche unterscheiden.

Für diese Fragestellung wird in dieser Arbeit neben der mechanischen Analyse auch der Einfluss verschiedener Partikel aus der Grenzfläche Hüftendoprothesenstiel und Knochenzement in unterschiedlicher Konzentration auf humane Osteoblasten verglichen. Die Partikel werden in einem speziell entwickelten In-vitro-Modell gewonnen. Dies spiegelt realitätsnah die Grenzfläche zwischen Endoprothesenstiel und den ihn umgebenden Zementmantel wider. Die Reproduzierbarkeit wird durch ein Steuerelement gewährleistet, welches konstante Druckverhältnisse und Bewegungszyklen herstellen lässt. Die Eigenschaften wurden entsprechend experimentellen Untersuchungen der Stiel-Zement-Grenzfläche gewählt (Bader, Steinhauser et al. 2004; Mann, Miller et al. 2008). Die applizierten

Relativbewegungen wurden mit einer Amplitude von 500 μm gemäß der aktuellen Literatur eingeleitet und somit die frühe Phase nach eingetretenem Debonding simuliert (Mann, Bartel et al. 1991; Bader, Steinhauser et al. 2004). Um insbesondere auf das Phänomen der Frühlockerungen einzugehen, wurde eine Versuchsdauer von drei Millionen Zyklen gewählt. Dies entspricht einer realen Gangbelastung von etwa drei Jahren (Bader, Steinhauser et al. 2004).

Nachteilig gegenüber einer Betrachtung des In-vivo-Zustandes ist allerdings die alleinige bidirektionale Bewegung des Endoprothesenstiels im Sinne einer Auf- und Abbewegung. Torsionsbelastungen in der Grenzfläche können mit der verwendeten Simulation nicht nachgestellt werden. Des Weiteren lag eine Beschränkung in der Prüfung unter trockenen Umgebungsbedingungen. Eine Testmodifikation hinsichtlich der Applikation eines physiologischen Milieus ist zukünftig geplant.

Für die Gewährleistung der Vergleichbarkeit wurden in dieser Arbeit anatomische zementierbare Hüftendoprothesenstiele aus einer CoCr28Mo6- sowie einer TiAl6Nb7-Legierung mit identischer Geometrie verwendet. Die Herstellung definierter Oberflächenrauheiten durch Kugelstrahlbehandlung nach dem initialen Fertigungsprozess sollte eine genaue Analyse des Einflusses von Werkstoff und Oberfläche ermöglichen.

4.1. Generierung und Charakterisierung der Abriebprodukte

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in der Analyse der Gesamtabriebmenge Unterschiede zwischen rauen und glatten Oberflächen beobachtet werden. Dabei setzten Endoprothesenstiele aus einer CoCr28Mo6-Legierung tendenziell mehr Partikel frei als Stiele aus einer TiAl6Nb7-Legierung, was klinischen Beobachtungen zu widersprechen scheint (Brien, Salvati et al. 1992). Wimmer et al. erklären diese Diskrepanz in einem Unterschied der Abriebmechanismen (Wimmer, Bluhm et al. 1998). Die Härte der Kobalt-Chrom-Oberfläche erlaubt im Gegensatz zu Titanlegierungen bei der Relativbewegung gegen die Knochenzementoberfläche keine Glättung und Einebnung der Oberflächenspitzen. Somit kommt es bei Reibbeanspruchung zu einer lokalen Abrasion der Chromoxid-Schicht, resultierend in einer Freisetzung von Kobalt-Chrom-Partikeln. Grundsätzlich muss auch von einem erhöhten Abriebverhalten an der Zementoberfläche durch vergleichsweise feste Endoprothesen-Oberflächen rauer Kobalt-Chrom-Stiele ausgegangen werden.

Eine weitere mögliche Erklärung können tribochemische Reaktionen geben. Im Gegensatz zu In-vivo-Bedingungen fehlt im verwendeten In-vitro-Modell die Schmierfilm-Bildung, was mit einer veränderten Bildung destruktiv wirkender Korrosionsprodukte wie z.B. Titandioxid (TiO_2) und einer Veränderung der Oberflächencharakteristik während des Abriebprozesses einhergeht (Willert, Brobäck et al. 1996; Bader, Steinhauser et al. 2005). Diese Frage könnte durch die Applikation feuchter Umgebungsbedingungen im vorliegenden Prüfmodell möglicherweise beantwortet werden.

Ein weiterer Einfluss auf das Abriebverhalten zementierter Hüftendoprothesenstiele besteht in der Verwendung verschiedener Zementzusammensetzungen. So zeigen Untersuchungen von Bader et al., dass das Vorhandensein eines Röntgenkontrastmittels die Zusammensetzung des Knochenzements verändern und darüber hinaus für eine veränderte Abriebsituation in der Grenzfläche (Dreikörper-Verschleiß) sorgen kann (Bader, Steinhauser et al. 2005). Damit werden auch die Aussagen von Breusch et al. zu den negativen abrasiven Effekten von Zirkondioxid bestätigt (Breusch, Schneider et al. 2000; Breusch and Kühn 2003). Morscher et al. verglichen Zirkondioxid-haltige Knochenzemente mit anderen handelsüblichen Zirkondioxid-freien Produkten. Sie konnten zwar einerseits eine höhere Abriebbeständigkeit des Zementköchers durch die Anwesenheit von Zirkondioxid feststellen, andererseits konnte aber ein stärkerer polierender Effekt auf raue Endoprothesenstiele beschrieben werden (Morscher et Wirz 2002). Dieses Phänomen kann zu einer Verringerung des Gesamtabriebes führen, erhöht aber die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens metallischer Abriebprodukte. Für eine bessere Vergleichbarkeit und Übersichtlichkeit der gewonnenen Daten verwendeten wir in dieser Arbeit mit Palacos R[®] der Firma Heraeus Kulzer GmbH nur eine handelsübliche PMMA-Zementvariante mit einem 15%-igen Zirkondioxid-Anteil.

Die Untersuchung der Hauptbestandteile der generierten Abriebpartikel zeigten deutliche Unterschiede im Metallgehalt zwischen den getesteten Stielen mit rauer und glatter Oberfläche mit einer Mehrproduktion durch raue Stiele. Allerdings deckten sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der generierten Abriebmengen durch die verwendeten Werkstoffe nicht mit denen der Literaturangaben. Viele Autoren beschreiben wesentlich höhere Mengen metallischen Abriebs im periprothetischen Gewebe und in der Synovialflüssigkeit gelockerter

Hüftendoprothesen aus Titan-Legierungen im Vergleich zu anderen Werkstoffen (Brien, Salvati et al. 1992). Zum Teil werden sogar hundertfach höhere Mengen angegeben (Bischoff, Freeman et al. 1994).

Dennoch ist deutlich auffallend, dass es besonders die Kombination von Werkstoff und Oberfläche ist, die es differenziert zu betrachten gilt. In den Abriebuntersuchungen der TiAl6Nb7-Stiele weisen die rauen Oberflächen eine deutliche Vermehrung des metallischen Abriebs auf. Dies wird durch Erhebungen der aktuellen Literatur gestützt. Als ursächlich wird die Abtragung der oberflächlichen und relativ empfindlichen TiO₂-Schicht durch die Mikrobewegungen in der Grenzfläche nach dem Debonding von Zement und Stiel angesehen (Eingartner, Volkmann et al. 2001; Eingartner, Ihm et al. 2002). Zusätzlich kommen die abrasiven Effekte der im Knochenzement enthaltenden Röntgenkontrastmittel-Partikel hinzu (Morscher et Wirz 2002; Bader, Mittelmeier et al. 2005).

Im Vergleich zu den getesteten CoCr28Mo6-Stielen fiel ein deutlich geringerer Unterschied zwischen rauen und glatten Stielen auf. In Bezug auf die Gesamtabriebmenge lässt sich die verstärkte abrasive Eigenschaft rauer Kobalt-Chrom-Stiele gegenüber Knochenzement bestätigen, denn infolge der Aufrauhung fanden sich im Abribspulver deutlich mehr Zementpartikel. Die erhöhten Gesamtabriebmengen stützen zwar die in der Literatur getroffenen Aussagen zum Frühversagen rauer Oberflächen, erschweren allerdings die Frage nach dem Werkstoff, welcher vornehmlich für die Initiierung pro-osteolytischer Effekte verantwortlich ist (Massoud, Hunter et al. 1997; Mcgrath, Shardlow et al. 2001). Unbeantwortet bleibt in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des im Knochenzement befindlichen Röntgenkontrastmittels. Es gibt allerdings aus der Literatur gute Erkenntnisse über den Einfluss der Zementzusammensetzung. Bedeutende abrasive Eigenschaften von Zirkondioxid-Partikeln wurden beschrieben und stellen damit einen weiteren ursächlichen Faktor in der Generierung metallischer Abriebpartikel dar (Bader, Mittelmeier et al. 2005).

Als quantitativ überwiegende Entität stellten sich in den generierten Abriebproben die PMMA-Partikel heraus, ohne signifikante Unterschiede im relativen Anteil zwischen den getesteten Materialien. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die metallischen Partikel die beeinflussende Variable in den Zellkulturexperimenten darstellen.

Ein weiterer relevanter Aspekt für die Realisierung in-vivo-ähnlicher Bedingungen ist die Größenverteilung der verwendeten Partikel zugunsten einer phagozytierbaren Größe. Dies erscheint besonders wichtig bei der Betrachtung der möglichen Phagozytose durch Zellen im periprothetischen Gewebe (O'Connor, Choi et al. 2004). Aus den Ergebnissen der Mastersizer-Untersuchungen der Abriebproben aller getesteten Werkstoffe und Oberflächenmodifikationen konnten durchschnittliche Partikelgrößen von 2,8 bis 4,4 μm ermittelt werden. Stellt man die gewonnenen Daten den aktuellen Literaturangaben zu Gewebearanalysen periprothetischer Membranen gegenüber, finden sich vergleichbare Werte (Brandwood, Noble et al. 1992; Salvati, Betts et al. 1993; Pioletti, Takei et al. 1999). Einige Autoren fanden jedoch auch wesentlich kleinere Partikel von unter 1 μm (Akisue, Bauer et al. 2002). Die eigenen Partikelanalysen ergaben, dass insbesondere der metallische Abrieb zu kleineren Partikeln tendiert. Zum Teil wurden Unterschiede in den Partikelgrößen beim Vergleich der Legierungen auf Kobalt-Chrom- bzw. Titan-Basis beschrieben. La Budde et al. beschrieben dabei kleinere Partikel für Kobalt-Chrom-Legierungen (La Budde, Orosz et al. 1994). Im Unterschied dazu variieren die Angaben zu den Größen der Knochenzement-Partikel deutlich stärker. Abrasionsprodukte aus PMMA konnten Ausdehnungen bis zu 100 μm aufzeigen (La Budde, Orosz et al. 1994). In den vorliegenden Analysen der Partikelgrößen fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der untersuchten Stielwerkstoffe und Oberflächenrauheiten. Zu beachten ist hierbei, dass stets das gesamte Abriebpulver und nicht die einzelnen Komponenten untersucht wurden.

Vor dem Hintergrund der Phagozytierbarkeit sowie der Stimulation pro-osteolytischer Effekte stellen Partikelmorphologie und -größe entscheidende Einflussfaktoren dar (Rubash, Sinha et al. 1998). Die Literaturangaben dazu sind jedoch uneinheitlich. Prinzipiell wird davon ausgegangen, dass Makrophagen fähig sind, Partikel unter einer Größe von 5 μm aufzunehmen. Goodman et al. gehen sogar davon aus, dass die Phagozytose bis zu einer Partikelgröße von 10 μm möglich ist (Goodman, Lind et al. 1998). Größere Abriebprodukte werden von Fremdkörperriesenzellen aufgenommen oder verbleiben extrazellulär und akkumulieren auf diese Weise im periprothetischen Gewebe (Goodman, Lind et al. 1998; Rubash, Sinha et al. 1998). Einen Effekt auf die durch Mediatoren vermittelte Zellantwort scheinen insbesondere die Partikel zu haben, die aufgrund ihrer Größe von den ortständigen Zellen, in erster Linie Makrophagen, aber auch von Osteoblasten, phagozytiert werden (Glant,

Jacobs et al. 1996; Rubash, Sinha et al. 1998; Vermes, Glant et al. 2001). Experimentelle Untersuchungen geben Grund zur Annahme, dass je kleiner die Partikel sind, desto größer ist der Einfluss auf die zellbiologische Reaktion und damit der Entwicklung periprotetischer Osteolysen (Rubash, Sinha et al. 1998; Yang, Kim et al. 1999).

4.2. Zellbiologische Effekte der Abriebpartikel

Nach Charakterisierung der Abriebprodukte war es Ziel dieser Arbeit, die Partikel unterschiedlicher Stiele und Oberflächenverarbeitungen zu beschreiben und deren Einfluss auf die Kollagenproduktion und Zytokinsynthese humaner Osteoblasten zu analysieren. Durch die Möglichkeit der Penetration abgeriebener Partikel aus dem Interface Stiel- und Knochenzement in das umgebende Gewebe ist neben Makrophagen und Osteoklasten auch das Verständnis der Rolle der Osteoblasten in der Pathogenese der aseptischen Lockerung relevant.

Das Design der Zellexperimente basiert dabei auf Studien, die Osteoblasten-ähnliche Zellen für Biokompatibilitätsstudien verwenden, da diese die physiologischen Verhältnisse besser widerspiegeln als die ebenfalls oft zur Anwendung kommenden Osteosarkomzellen (Anissian, Stark et al. 2002; Fritz, Glant et al. 2006). Heinemann et al. konnten zeigen, dass Osteoblasten-ähnliche Zellkulturreihen in der Lage sind, bestimmte Oberflächenantigene zu exprimieren, die denen von Makrophagen gleichen wie z.B. CD68. Dies konnte bei bestimmten Osteosarkomzellen (HOS 58) nicht nachgewiesen werden (Heinemann, Lohmann et al. 2000). Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass aufgrund des Kultivierungsprozesses interindividuelle Unterschiede der einzelnen Zellpopulationen auftreten können. Grund ist die Zellgewinnung aus explantierten Hüftköpfen von Patienten unterschiedlichen Alters und Geschlechts, was eine Schwankung der Zellvitalität mit sich bringt. Um dieses Phänomen zu adressieren, könnte ein Poolen der gezüchteten Zellkulturen die Versuchsanordnung homogener gestalten (Zreiqat et Howlett 1999; Zreiqat, Valenzuela et al. 2005).

Für die Beurteilung der Zellmodulation durch die Anwesenheit von Abriebprodukten wurden Parameter gewählt, die Wachstum, Metabolismus und interzelluläre Kommunikation widerspiegeln. Zahlreiche Studien konnten bereits zeigen, dass Abriebpartikel osteoblastische Zelllinien direkt aktivieren können und von ihnen

phagozytiert werden (Lohmann, Schwartz et al. 2000; Vermes, Glant et al. 2001). Dabei scheinen laut Heinemann et al. die Osteoblasten in der Zellkultur Eigenschaften von Makrophagen anzunehmen, was sich im Vorhandensein von CD68-Antigenen ausdrückt (Heinemann, Lohmann et al. 2000). Auf Grundlage dieses Erkenntnis sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, inwieweit sich die Reaktionen humaner Osteoblasten auf unterschiedliche Partikel aus der Grenzfläche Endoprothesenstiel und Knochenzement unterscheiden. Die in dieser Arbeit verwendeten Partikelkonzentrationen orientieren sich an Literaturangaben (Allen, Myer et al. 1997; Pioletti, Takei et al. 1999). Die Zellkulturexperimente zeigten für alle getesteten Partikel und Zellparameter eine deutliche Abhängigkeit von der Partikelkonzentration. Höhere Konzentrationen führten bei nahezu allen Partikeln zu einer deutlichen Reduktion des Zellüberlebens. Lediglich Zirkondioxid-Partikel schienen eine weniger inhibitorische Wirkung auf die Proliferation der Osteoblasten zu haben. Dies bestätigt den bereits durch andere Autoren beschriebenen zytotoxischen Effekt metallischer Abriebpartikel und die weniger negativen Effekte von Keramik-Partikeln (Wang, Nesti et al. 2002).

Darüber hinaus kam es zu deutlich vermehrten zytotoxischen Effekten durch Grenzflächenprodukte mit einem hohen Kobalt-Chrom-Gehalt im Vergleich zu Titanhaltigen Partikeln bei gleicher im Zellversuch eingesetzter Partikelkonzentration, was ebenfalls im Einklang zur Literatur steht (Allen, Myer et al. 1997; Yao, CS-Szabo et al. 1997; Goodman, Ma et al. 2006).

Pioletti et al. konnten unter Verwendung höherer Konzentrationen (bis zu 10mg/ml) auch für Titan-Partikel pro-apoptotische Effekte auf humane Osteoblasten mit einem Abfall der Zellzahl im zeitlichen Verlauf ermitteln (Pioletti, Takei et al. 1999). Eine initial konstant bleibende bzw. leicht steigende Zellzahl in Folge der Inkubation mit niedrigeren Konzentrationsstufen nach 24 Stunden erklärten sie über den Verbrauch von Partikeln durch die Internalisierung der Zellen im Rahmen der Phagozytose. Damit hätte die Möglichkeit zur Zellteilung mit konsekutiver Zunahme der Zellzahl bestanden. Mit dem Überschreiten einer kritischen Partikelmenge verbleiben allerdings zu wenige teilungsfähige Osteoblasten. Es bleibt daher offen, ob eine Erhöhung der Titankonzentration in dem hier dargestellten Versuchsaufbau zu einer deutlicheren Reduktion des Zellüberlebens humaner Osteoblasten führt.

Es bleibt weiter zu klären, ob der Verlust vitaler Knochenzellen durch direkte zytotoxische Reaktionen der Abriebpartikel oder durch eine Mediator-induzierte

Apoptose ausgelöst wird. So beschrieben Pioletti et al., dass die durch den Zellzerfall entstehenden Produkte sich negativ auf das Zellüberleben auswirken (Pioletti, Takei et al. 1999).

Im Fall von Kobalt-Chrom konnten Fleury et al. nachweisen, dass die entsprechenden Ionen zu einem oxidativen Stress in Osteosarkomzellen führen mit folgendem Zelltod (Fleury, Petit et al. 2006). Eine differenziertere Veranschaulichung gelang der Arbeitsgruppe um Allen et al. (Allen, Myer et al. 1997). Diese konnte zeigen, dass im Vergleich von Kobalt-, Chrom- und Kobalt-Chrom-Partikeln insbesondere Kobalt-Partikel toxisch gegenüber den verwendeten Osteosarkomzellen waren, wohingegen Chrom und Kobalt-Chrom-Partikel in Konzentrationen von 0,01 bis 1,0 mg/ml gut toleriert wurden (Allen, Myer et al. 1997).

Hinsichtlich PMMA-Partikeln wurde in der Vergangenheit ebenfalls ein negativer Effekt auf den Zellmetabolismus und die Vitalität humaner Knochenzellen gezeigt (Lohmann, Dean et al. 2002; Chiu, Ma et al. 2006; Schulze, Lochner et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Partikelentität jedoch nicht separat analysiert. Aufgrund der kaum variierenden relativen Mengen im generierten Abrieb wird angenommen, dass die vorliegenden PMMA-Partikel die ermittelten Unterschiede in den Zellreaktionen nicht erklären können. Aktuelle Literaturangaben zu den Effekten von PMMA konnten zeigen, dass die Zytotoxizität sich zeitabhängig im Verlauf der Verbindung der einzelnen Zementkomponenten verändert und nach abgeschlossener Polymerisation geringer ist (Ciapetti, Granchi et al. 2000). Schulze et al. postulierten, dass der höhere Anteil des verbliebenen Monomers im Vergleich verschiedener Zemente bei Simplex P und Cemex Genta höher ist als bei Palacos R mit der Folge unterschiedlicher Apoptose- und Nekroseraten nach Inkubation mit diesen Zementtypen (Schulze, Lochner et al. 2013).

Neben dem reinen Zellüberleben spielt auch der Metabolismus der Osteoblasten eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase. Takagi et al. postulieren einen engen Zusammenhang zwischen der Makrophagen-vermittelten Fremdkörperreaktion, der Aktivierung der Knochenresorption durch Osteoklasten und dem defizitären Aufbau durch Osteoblasten aufgrund des Vorliegens von Abriebpartikeln (Takagi, Santavirta et al. 2001). Die Rolle der Makrophagen ist in diesem Zusammenhang bereits detailliert charakterisiert worden (Ingham, Green et al. 2000; Petit, Catelas et al. 2002; Ingram, Kowalski et al. 2005; Goodman 2007; Goodman et al. 2010). Die überschießende Aktivierung der Osteoklasten durch

freigesetzte Zellmediatoren führt zu einem Abbau der Knochenmatrix im periprotetischen Gewebe. Ein suffizienter Wiederaufbau durch Osteoblasten bleibt allerdings aus. Zahlreiche Arbeitsgruppen bestätigen die Vermutung, dass der spongiöse Knochen um die Hüftendoprothese mit einer verminderten Sekretion knochenspezifischer extrazellulärer Proteine assoziiert ist (Purdue, Koulouvaris et al. 2007). Begründet wird dies unter anderem durch die Affektion des Stoffwechsels der Osteoblasten. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Vermutung und demonstrieren ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein hoher Mengen an Abriebpartikeln und der verminderten Sekretion extrazellulärer Matrix. Kollagen Typ I ist das am häufigsten vorkommende extrazelluläre Protein im menschlichen Knochen und die Synthese kann anhand spezifischer Marker quantifiziert werden (Beresford, Gallagher et al. 1986). Durch die Bestimmung des Carboxy-terminalen Propeptids von Typ I Kollagen können Störungen im Metabolismus humaner Osteoblasten ermittelt werden (Simon, Krane et al. 1984).

In der vorliegenden Arbeit finden sich analoge Ergebnisse zur aktuellen Literatur und unterstreichen vor allem den konzentrationsabhängigen Effekt der Abriebpartikel (Allen, Myer et al. 1997; Choi, Koh et al. 2005). Partikuläres Titan wird als einflussnehmend auf den Knochenmetabolismus und die Zelldifferenzierung beschrieben (Wang, Nesti et al. 2002; O'Connor, Choi et al. 2004; Choi, Koh et al. 2005). Ein Trend hinsichtlich einer Hemmung der Prokollagen-Synthese besonders durch hohe Konzentrationen konnte herausgestellt werden, wenngleich auch ohne Signifikanz ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle und bei insgesamt hoher Schwankungsbreite. Die Ergebnisse von Yao et al. bestätigen diese Feststellung (Yao, CS-Szabo et al. 1997). Diese begründeten die Suppression der Kollagenkodierenden Gene weniger durch bestimmte Materialkompositionen, sondern vor allem durch die Partikelgröße. Es wird vermutet, dass besonders kleine Partikel die Transkription der mRNA der Prokollagen-codierenden Gene beeinflusst und somit zu einer verminderten Sekretion führt (Yao, CS-Szabo et al. 1997). Vermes et al. zeigten eine Hemmung der Prokollagen-Expression aufgrund einer Aktivierung des Tyrosin-Kinase-NF- κ B-Signalweges nach Phagozytose von verschiedenen Abriebpartikeln ohne einen deutlichen Unterschied zwischen den getesteten Entitäten (Vermes, Chandrasekaran et al. 2001). Es wird weiterhin darauf hingewiesen, dass neben der direkten Beeinflussung vor allem die interzellulären Mechanismen die Proteinbiosynthese beeinflussen. Dies unterstreichen auch Zreiqat

et al. mit dem Nachweis einer mRNA-Reduktion im Rahmen der Prokollagen-Expression durch die Anwesenheit bestimmter Zytokine wie z.B. Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) (Zreiqat, Crotti et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich insgesamt auch nur geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Partikeltypen. Auffällig war jedoch eine deutliche Reduktion der Prokollagen-Synthese nach Inkubation mit Partikeln aus den Versuchen mit rauen CoCr28Mo6-Stielen, was eher den Ergebnissen von Allen et al. entspricht (Allen, Myer et al. 1997). Allerdings relativieren Allen et al. die Ergebnisse aufgrund der zeitabhängigen Variation der Zellzahl während des Experimentes. Kollagen Typ 1 ist ein Protein, welches in das Zellkulturmedium abgegeben wird. Im Laufe der Inkubationszeit (bis 10 Tage) steigt die Konzentration dieses gewählten Markers im Kulturmedium. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt können Messungen zum entsprechenden Marker erfolgen, allerdings verändert sich auch die Zahl der in Kultur befindlichen Osteoblasten. Daher bleibt unklar, welchen Anteil die individuelle Zelle zur Gesamtmenge des Prokollagen Typ 1 beiträgt. Somit gibt die Untersuchung von Prokollagen Typ 1 nur eine rein quantitative Information zur Gesamtmenge dieses sekretorischen Proteins an. Zusätzlich erschwert wird die Interpretation durch die Anwesenheit potenziell zytotoxischer Abriebpartikel wie z.B. Kobalt. Durch Minderung des Zellüberlebens verringert sich auch die Kapazität zur Proteinbiosynthese. Folglich ist die Unterscheidung zwischen tatsächlicher Beeinflussung der Syntheseleistung und einem allgemeinen toxischen Effekt auf die Zelle selbst schwierig (Allen, Myer et al. 1997). Stattdessen wäre laut Allen et al. die Verwendung von zellständigen Markern wie der spezifischen alkalischen Phosphatase korrigiert auf die Zellzahl ein geeigneter Parameter, um die Syntheseaktivität der einzelnen Zelle zu bestimmen (Allen, Myer et al. 1997). Weitere Studien sind daher notwendig, um Langzeiteffekte von Abriebpartikeln auf die Syntheseleistung von Osteoblasten zu untersuchen.

Wie bereits erwähnt, ist in den letzten Jahren das Wissen über die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Zellen des periprothetischen Gewebes stetig gewachsen (Purdue, Koulouvaris et al. 2007). Die Interaktionen zwischen Makrophagen, Osteoklasten und Osteoblasten spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Knochenmetabolismus (Gallo, Kamínek et al. 2002; Purdue, Koulouvaris et al. 2007).

Der Remodelling-Prozess des periprothetischen Knochengewebes wird kontrolliert durch eine Reihe systemischer und lokaler Faktoren wie z.B. Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α) (Ingham, Green et al. 2000; Holding, Findlay et al. 2006). Es ist bekannt, dass Abriebpartikel bei Makrophagen eine Freisetzung verschiedener pro-osteolytischer Zytokine induzieren können (Glant, Yao et al. 1996; Lee, Brennan et al. 1997; Nakashima, Sun et al. 1999; Ingham, Green et al. 2000; Ingram, Kowalski et al. 2005). Die fehlende Biodegradierbarkeit der Partikel führt zu einer kontinuierlichen Aktivierung weiterer proinflammatorischer und osteolytisch wirkender Proteine, mit dem Resultat eines chronisch entzündlichen Zustandes und dem Verlust tragfähigen periprothetischen Knochens (Fritz, Jacobs et al. 2005; Fritz, Glant et al. 2006; Purdue, Koulouvaris et al. 2007). Ein wichtiger Signalweg ist dabei die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren über die Tyrosin Kinase. Laut Vermes et al. tritt dieser Mechanismus bei allen Zellen auf, die Abriebpartikel im periprothetischen Gewebe phagozytieren können (Vermes, Chandrasekaran et al. 2001). Die Folge ist eine Expression von Zytokinen, Chemokinen und Prostaglandinen, die die Zellfunktionen des periprothetischen Gewebes sowohl para- als auch autokrin beeinflussen können (Zreiqat, Crotti et al. 2003). Zreiqat et al. beschrieben bereits für Osteoblasten-ähnliche Zellen, dass Interleukin-1 α , Interleukin-6, Tumor Nekrose Faktor alpha und Prostaglandin E₂ modifizierend auf die mRNA Expression von Thrombospondin, alkalischer Phosphatase, Osteocalcin, Osteopontin und Prokollagen einwirken (Zreiqat, Crotti et al. 2003). Auch Goodman et al. konnten diese Beobachtung zum Teil belegen (Goodman, Ma et al. 2006). Allerdings bestehen noch Fragen bezüglich der Abhängigkeit dieser Reaktionen von unterschiedlichen Werkstoffen, da vergleichende Analysen bislang selten durchgeführt wurden. Daher war ein Schwerpunkt dieser Arbeit, ein Zytokin-Profil humaner Osteoblasten gegenüber verschiedenen Abriebprodukten zementierter Hüftendoprothesen zu erstellen. Um dieses zu realisieren, kam eine Methode zur Anwendung, die eine Bestimmung unterschiedlicher Zytokine in nur einem Well einer Mikrotiter-Platte ermöglicht.

Hinsichtlich der IL-6-Expression zeigten alle Abriebprodukte mit einem hohen Anteil metallischer Partikel in ähnlicher Weise eine deutliche Inhibition bei einer Konzentration von 1,0 mg/ml und keine relevante Stimulation bei 0,01 mg/ml. Tendenziell konnte eine diskrete Erhöhung der IL-6 Expression durch titanhaltige Partikel beobachtet werden. Andere Arbeitsgruppen fanden analoge Ergebnisse

(Anissian, Stark et al. 2002; Wilke, Bartsch et al. 2005). So berichten Anissian et al. über eine Verminderung der IL-6-Synthese bei der Verwendung Kobalt-Chrom-haltiger Partikel ab einer Konzentration von 20 µg/ml. Allerdings waren vorher deutliche stimulatorische Effekte bei niedrigeren Konzentration aufgefallen (Anissian, Stark et al. 2002). Dies steht in Widerspruch zur vorliegenden Arbeit. Jedoch ist nicht geklärt, ob die beobachtete Inhibition nicht ausschließlich durch den zytotoxischen Effekt von Kobalt-Chrom-Partikeln bedingt ist, wodurch es zu einer Verminderung der Zytokin-freisetzenden Zellen kommt. Unter der Annahme, dass glatte Endoprothesenstiele aus CoCr28Mo6 tendenziell etwas weniger metallische Partikel freisetzen und dem Trend eines geringen stimulatorischen Effektes bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml, lässt sich schließen, dass möglicherweise eine weitere Verringerung der Konzentration die IL-6-Produktion stimulieren könnte. Die Interleukin-6-Freisetzung bewirkt verschiedene Effekte. Zum einen kommt es zu einer Aktivierung der Osteoklasten-Funktion. Zum anderen bewirkt IL-6 eine Suppression der Genexpression der Prokollagene $\alpha 1[I]$ und $\alpha 1[III]$ in Osteoblasten, mit resultierender Störung der Biosynthese des Knochenkollagens (Fritz, Glant et al. 2006). Interessanterweise werden auch positive Effekte auf die Differenzierung von Progenitorzellen in Osteoblasten und anti-apoptotische Eigenschaften genannt (Kwan Tat, Padrines et al. 2004; Schulze, Lochner et al. 2013). Durch diese bidirektionale Wirkung spielt IL-6 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase (Kwan Tat, Padrines et al. 2004; Purdue, Koulouvaris et al. 2007).

Neben IL-6 ist Interleukin-8 ein weiterer sezernierter Botenstoff, dessen gleichfalls gesteigerte Produktion über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (NF- κ B) als pathogenetischer Baustein der aseptischen Lockerung beschrieben wurde (Fritz, Jacobs et al. 2005). Interleukin-8 dient als frühes inflammatorisches Chemokin der Aktivierung und Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Fritz, Jacobs et al. 2005). Im Unterschied zu IL-6 führt IL-8 zu einer Knochenresorption über die Freisetzung von Elastase und Cathepsin G aus aktivierten Granulozyten (Fritz, Glant et al. 2006). Fritz et al. konnten detailliert zeigen, dass Titan-Partikel über intrazelluläre Signalwege die Freisetzung von IL-8 stimulieren (Fritz, Glant et al. 2006). Die Resultate der vorliegenden Arbeit sind dagegen uneinheitlicher. Es fanden sich insbesondere für die mittleren Konzentrationen der getesteten Partikel stimulatorische Effekte auf die IL-8-Synthese, verbunden mit einem leichten

Übergewicht der Titan-haltigen Abriebpulver. Zusammenfassend ergibt sich ein ähnliches Zytokin-Profil wie in der Arbeit von Haleem-Smith et al. (Haleem-Smith, Argintar et al. 2012). Stimulatorische Effekte für Titan-Partikel fanden sich dort besonders für IL-8, dagegen war die IL-6-Freisetzung in deren Versuchsaufbau nicht beeinflusst. Die Mengen an exprimierten TNF- α lag ebenso unter der Nachweisgrenze (Haleem-Smith, Argintar et al. 2012).

Eine vermehrte Freisetzung proosteolytischer Zytokine durch Osteoblasten sowie Makrophagen wurde ebenfalls durch Zirkondioxid-haltigen Knochenzement beschrieben (Ingham, Green et al. 2000; Lohmann, Dean et al. 2002; Shardlow, Stone et al. 2003). In dieser Arbeit konnte dies zum Teil bestätigt werden. Insbesondere die Interleukin-6-Synthese war mit einer leichten, statistisch nicht-signifikanten Stimulation der Expression nach Inkubation durch Zirkondioxid-Partikel verbunden. Es zeigten sich dagegen kaum Effekte auf die IL-8-Synthese im Vergleich zu den partikelfreien Kontrollen.

In Bezug auf die Interpretation dieser Ergebnisse sollte, wie es bereits von Allen et al. beschrieben wurde, bedacht werden, dass Untersuchungen, die sich auf die Expression von Proteinen wie Kollagen oder Zytokinen richten, stets durch eine variierende Zellzahl während des laufenden Experimentes beeinträchtigt werden (Allen, Myer et al. 1997). Zusätzlich wird dies durch die potenziell zytotoxischen Effekte durch Abriebpartikel einerseits, aber auch das Vorhandensein von Zellmediatoren mit pro-bzw. anti-apoptotischen Eigenschaften im Kulturmedium und die damit verbundene Beeinflussung vitaler Zellen andererseits, erschwert (Pioletti, Takei et al. 1999). Daher ist eine Differenzierung inhibitorischer von zelltoxischen Effekten in Ansätzen, die allein auf die Proteinsynthese abzielen, schwierig (Allen, Myer et al. 1997). Ebenso können stimulatorische Effekte durch den Verlust aktiver Zellen verschleiert werden. Die Frage zur Zytokin-Expression nach Inkubation vor allem mit Kobalt-Chrom-Partikeln und deren deutlichen zytotoxischen Eigenschaften kann daher nicht abschließend beantwortet werden. Weitere Untersuchungen mit geringeren Konzentrationen könnten Aufschluss darüber geben, inwieweit auch Kobalt-Chrom zu einer Stimulation der Zytokin-Expression führt.

Nichtsdestotrotz unterstützen die gewonnen Erkenntnisse die Theorie, dass Abriebprodukte aus der Grenzfläche zwischen Hüftendoprothesenstiel und Knochenzement den Metabolismus humaner Osteoblasten alterieren können. In

diesem Zusammenhang ist offensichtlich, dass insbesondere metallische Partikel aus der Grenzfläche zementierter Hüftendoprothesenstiele die Integrität der Knochenzellen stören und somit zu einer Verminderung der Implantatverankerung sorgen können (Choi, Koh et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Materialien und Oberflächenmodifikationen zementierter Hüftendoprothesenstiele untersucht. Abriebpartikel von Stielen aus Titan zeigten weniger hemmende Effekte auf die Vitalität von humanen Knochenzellen und die Produktion knochenspezifischer Proteine. Allerdings konnte in der Analyse eine Tendenz zur Stimulation proinflammatorischer und proosteolytischer Zytokine gezeigt werden, die mit einer Störung des Knochenstoffwechsels bis hin zum Knochenabbau einhergehen.

Im Gegensatz dazu zeigten Kobalt-Chrom-haltige Partikel eine Minderung der Zellvitalität und dadurch eine direkte Beeinflussung des Metabolismus humaner Osteoblasten. Die Untersuchungen bestätigen, dass Titan und seine Legierungen weniger zytotoxisch wirken als Kobalt-Chrom (Buchhorn, Willert et al. 1992; Bischoff, Freeman et al. 1994; Bi, Van De Motter et al. 2001; Boyer, Lazennec et al. 2009).

Berücksichtigt werden muss neben metallischen aber auch das Vorhandensein von PMMA- und Zirkondioxid-Partikeln. Der Nachweis dieser Partikeltypen im fibrösen Gewebe um gelockerte Hüftendoprothesen als auch in Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen lässt ebenfalls vermuten, dass sie ebenfalls einen Beitrag zur Entwicklung der aseptischen Lockerung zementierter Hüftendoprothesen leisten (Agins, Alcock et al. 1988; Brien, Salvati et al. 1992; La Budde, Orosz et al. 1994; Jones, Frondoza et al. 1999; Lohmann, Schwartz et al. 2000; Lohmann, Dean et al. 2002; Ito, Matsumoto et al. 2004). Die Einflüsse der Knochenzementbestandteile auf Zellvitalität und Metabolismus waren in dieser Arbeit eher gering, konnte aber durch andere Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Ingham, Green et al. 2000; Lohmann, Schwartz et al. 2000; Lohmann, Dean et al. 2002; Ingram, Kowalski et al. 2005; Schulze, Lochner et al. 2013). Offen bleibt, ob in den vorliegenden Untersuchungen die durchschnittliche Größe für die generierten Zementpartikel überwiegend im oder außerhalb des phagozytierbaren Größenbereiches lagen und daher eine verhältnismäßig geringe Zellreaktion nach Partikelkontakt bewirkten.

Je nach Bewertung der einzelnen untersuchten Parameter scheint insgesamt ein tendenziell besseres Abschneiden von Hüftendoprothesenstielen auf Titan-Basis

gegenüber der verwendeten Kobalt-Chrom-Legierung in den durchgeführten In-vitro-Versuchen vorzuliegen. Ob diese Ergebnisse den klinischen Einsatz von zementierten Titan-Stielen mit glatter Oberfläche rechtfertigen, ist jedoch fraglich. Unterstützt werden gute Langzeitresultate einiger zementierter Hüftendoprothesenstiele auf Titan-Basis in klinischen Studien (Neuß, Clemens et al. 2005). Demgegenüber bestehen auch zahlreiche negative Berichte anderer Endoprothesenstiele aus Titan-Legierungen (Massoud, Hunter et al. 1997; Lichtinger, Schürmann et al. 2000; Eingartner, Volkmann et al. 2001). Zusammenfassend lässt sich aus den aktuellen klinischen und zellbiologischen Untersuchungen eine Verwendung von Titan als Werkstoff zementierter Hüftendoprothesen unter bestimmten Umständen wie z.B. gerades Stieldesign, glatte Stieloberfläche und adäquater Zementmantel nicht grundsätzlich verneinen.

Die Arbeit verdeutlicht, dass das Ausmaß osteolytischer Reaktionen nicht allein vom Material abhängig ist, sondern unter anderem in einem Zusammenspiel von Material, Design und Oberflächenmodifikation zementierter Hüftendoprothesen begründet ist. Aus den durchgeführten Untersuchungen geht hervor, dass insbesondere die Oberflächentopographie, die Abriebmenge und die Freisetzung metallischer Partikel beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass die metallischen Partikel, und dabei überwiegend diejenigen von Endoprothesenstielen aus einer CoCr28Mo6-Legierung, Veränderungen der Zellzahl und der Expression spezifischer Proteine und proosteolytischer Mediatoren bewirken. Daher erscheint es notwendig, eine Freisetzung metallischer Partikel zu verhindern. Die Verwendung rauer Oberflächenverarbeitungen zugunsten einer besseren Zementadhäsion sollte unter Berücksichtigung der hier gewonnenen Erkenntnisse für zementierte Hüftendoprothesenstiele überdacht werden (Cannestra, Berger et al. 2000).

Bisher ist die klinische und radiologische Untersuchung die Methode der Wahl für die Diagnose der aseptischen Lockerung. Gerade die radiologische Diagnostik bereitet jedoch in den frühen Stadien Probleme. Häufig werden Befunde erst im Stadium der manifesten Lockerung sichtbar. Daher ist man bestrebt, alternative diagnostische Methoden zu finden. Maier et al. untersuchten in einer klinischen Studie, die Möglichkeit bestimmte prädiktive Biomarker für eine aseptische Lockerung zu identifizieren (Maier, Eberhardt et al. 2014). Die Tartrat-resistente saure Phosphatase konnte in frühen Phasen der Abriebpartikel-induzierten Osteolyse eine verminderte Serumkonzentration aufweisen. Gleiches bestätigten Landgraeber et al.

(Landgraeber, Löer et al. 2010). Sie konnten zudem eine Vermehrung der Serum-Level des C-terminalen Telopeptids von Kollagen Typ 1 beobachten. He et al. postulieren, dass eine Verlaufs- und Schweregradebeurteilung anhand zusätzlicher Marker zukünftig möglich sein sollte (He, Wu et al. 2013).

Aufgrund der bestehenden Schwierigkeiten in der Behandlung aber auch der frühzeitigen Diagnostik der Implantatlockerung ergibt sich der Gedanke zum präventiven Vorgehen. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich ableiten, dass ein wichtiges Ziel die Minimierung von Abriebprodukten sein muss. Verschiedene Einflussgrößen wurden beschrieben und vor allem der Zusammenhang von Werkstoff und Oberflächentopographie aufgezeigt.

Durch deren Optimierung kann die Freisetzung von Abriebpartikeln aus der Grenzfläche Endoprothesenstiel und Knochenzement reduziert und damit das Auftreten negativer Zellreaktionen vermindert werden, mit dem Ergebnis längerer Standzeiten. Idealerweise sollten Abriebpartikel eines optimalen Materials geringe zytotoxische Effekte aufweisen und keine Veränderung des Zytokin-Profiles induzieren.

Unterschiedliche Ansätze wurden bereits unternommen, die Abriebfestigkeit von Hüftendoprothesenstielen zu optimieren (Browne and Gregson 1994; Crowninshield, Jennings et al. 1998; Cannestra, Berger et al. 2000; Hinrichs, Kuhl et al. 2003; Della Valle, Zoppi et al. 2005). Beispielhaft seien Modifikationen der Oberfläche zum Beispiel durch ein von Chu et al. beschriebenes Plasma-Bestrahlungsverfahren genannt (Chu, Chen et al. 2002). Die Mehrheit der Verfahren zur Oberflächenoptimierung richtet sich allerdings auf unzementierte Hüftendoprothesenstiele mit der Etablierung einer Oberfläche, die das Einwachsen der Endoprothese in den Knochen verbessert. Des Weiteren fehlen genaue Analysen des entstehenden Abriebs sowie die Auswirkungen auf Zellen des periprotetischen Gewebes. Aufgrund des reproduzierbaren Prüfmodells dieser Arbeit ist eine zukünftige Analyse solcher Oberflächenmodifikationen möglich.

Aus den durchgeführten zellbiologischen Untersuchungen ergeben sich Implikationen für Diagnostik und Therapie der aseptischen Implantatlockerung. In therapeutischer Hinsicht stellt sich mit dem Erkenntnisgewinn zu molekularbiologischen und immunologischen Aspekten der aseptischen Lockerung die Frage, ob es möglich ist, diese mit entsprechenden biologischen Therapien zu unterbinden. Ein Ansatz könnte sein, eine Reduktion der Zellantwort auf freigesetzte

Abriebpartikel zu bewirken, um Patienten eine risikoreiche Wechsel-Operation zu ersparen. Allerdings gelang es bisher nicht, Medikamente zu entwickeln, die gezielt auf die Osteolyse im periprotektischen Knochengewebe hemmenden Einfluss nehmen. Ausgehend von den bisherigen Forschungen, den ökonomischen und regulatorischen Gegebenheiten gibt es einige nennenswerte Ansätze für derartige biologische Therapien (Smith et Schwarz 2014). Vordergründig werden etablierte Therapien der Osteoporose wie z.B. die Gabe von Bisphosphonaten angeführt. Diese weisen eine Hemmung der Osteoklastenaktivität auf (Smith et Schwarz 2014). Auch die Stimulation osteoanaboler Prozesse durch rekombinantes Parathormon (Teriparatid) könnte die ossäre Integration des Implantates verbessern (Smith et Schwarz 2014).

Ebenso könnte die Unterbrechung der interzellulären Kommunikation im Rahmen der inflammatorischen Signalwege ein therapeutisches Ziel darstellen. So konnten Childs et al. feststellen, dass ein TNF- α -Blocker (Etanercept) in der Lage war, die Partikel-induzierte Knochenresorption durch aktivierte Osteoklasten zu hemmen (Childs, Goater et al. 2001). Eine breite Anwendung in der Behandlung der aseptischen Lockerung existiert bisher allerdings nicht.

Das Verständnis der Pathogenese der aseptischen Lockerung mit der Identifizierung der kritischen Zusammenhänge der periprotektischen Zellstrukturen aber auch die Einflussgrößen für das Entstehen von Abriebpartikeln könnten zukünftig weitere effektive Ansätze zur Therapie und Prävention der aseptischen Lockerung bieten.

4.3. Limitationen der Arbeit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt deutliche Reaktionen humaner Osteoblasten auf verschiedene Abriebpartikel. Zum Teil konnten signifikante negative Effekte auf die Zellvitalität und den Metabolismus beobachtet werden. Dennoch ergeben sich einige Limitationen, die eine abschließende Bewertung der erhobenen Daten erschweren und Bestandteil zukünftiger Forschungsvorhaben sein sollten.

Die Herstellung der verwendeten und kommerziell hergestellten Partikel ist nur näherungsweise vergleichbar mit den Bedingungen im menschlichen Körper. Die Implantate sind in-situ dauerhaft einem feuchten Milieu ausgesetzt und befinden sich zum Teil unter Luftabschluss. Die vorgestellte Versuchsanordnung erlaubt jedoch gegenwärtig nur Stieltestungen unter trockenen Umgebungsbedingungen. Zukünftig

ist hier die Prüfung unter feuchten Bedingungen durch die Applikation physiologischer Flüssigkeiten in einen geschlossenen Testablauf vorgesehen, um zum Beispiel die Entstehung saure Metabolite und deren Einfluss auf die Korrosionsbildung genauer zu simulieren (Willert, Brobäck et al. 1996).

Es schließt sich die Betrachtung der gewonnenen Partikel und deren weitere Verwendung an. In dieser Arbeit kommen in den Zellversuchen hauptsächlich Partikelgemische aus metallischem Abrieb und Zementabrieb zur Anwendung. Wenngleich sich relativ betrachtet nur die Menge metallischen Abriebs im nativen Pulver ändert, so werden die Zellkulturen stets mit Zementpartikeln versetzt. In den vorliegenden Untersuchungen war der Effekt von Zementpartikeln nachweislich eher gering, dennoch zeigen andere Studien, dass hierdurch der Stoffwechsel humaner Osteoblasten und anderer Zellen des periprothetischen Gewebes negativ beeinflusst wird (Lohmann, Dean et al. 2002; Ingram, Kowalski et al. 2005; Schulze, Lochner et al. 2013). Zukünftig ist eine vollständige Separierung des nativen Abriebs in seine einzelnen Bestandteile zu fordern, um exakte Aussagen zu deren Wechselwirkung auf Zellstoffwechselprozesse treffen zu können. Insbesondere ist nach wie vor der Einfluss der metallischen Abriebpartikel in diesem Zusammenhang von Relevanz. Zukünftige Forschungen werden daher auch Analysen metallischer Implantatwerkstoffe und Oberflächenverarbeitungen beinhalten. So sollte zum Beispiel geprüft werden, ob sich die guten klinischen Ergebnisse der häufig zur Anwendung kommenden zementierten Hüftendoprothesenstiele aus glatt-poliertem Edelstahl auf zellulärer Ebene widerspiegeln (Howie, Middleton et al. 1998).

Hinsichtlich der Zellreaktionen sollte zudem geklärt werden, welche weiteren Zellparameter sich durch eine Variation von Abriebqualität und -quantität verändern. Hier konnten bereits Screening-Verfahren weitere Zellmediatoren wie z.B. monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) oder vascular endothelial growth factor (VEGF) herausgearbeitet werden (Schulze, Lochner et al. 2013).

Es könnten weitere Schlüsselstellen der Pathogenese der aseptischen Lockerung identifiziert und gezielte präventive bzw. therapeutische Strategien abgeleitet werden, mit dem Ziel einer Verbesserung der Standzeiten zementierter Hüftendoprothesen.

Eine weitere Einschränkung ergibt sich in Bezug auf die Kultivierung humaner Osteoblasten. Die aktuellen Daten beziehen sich auf wenige Zellkulturen verschiedenen Ursprungs, da jede Kultur aus einem explantierten Femurkopf eines

anderen Patienten stammt. Es ergeben sich hierdurch große Schwankungen insbesondere bei der Betrachtung der Zytokinexpression. Unklar bleibt, inwieweit der individuelle genetische Einfluss sich in den Ergebnissen niederschlägt.

Durch eine Erhöhung der Anzahl durchgeführter Versuche bzw. ein Poolen der gewonnenen Zellen könnte statistisch dieser Effekt beseitigt werden. Des Weiteren könnte über eine Genanalyse die Grundaktivität der verwendeten Zellen vor Partikelkontakt bestimmt werden. Ungeachtet dessen ist auch die Bewertung der einzelnen Kultur Limitationen unterworfen, da, wie bereits erwähnt, die ermittelte Synthesemenge der verschiedenen Proteine nicht auf die vorliegende Zellzahl zum Messzeitpunkt korrigiert wurde. Durch das zeitgleiche Auftreten von Apoptose und Nekrose aber auch der Zellproliferation kann nicht genau bestimmt werden, ob die Veränderung der Gesamtmenge eines Zytokins oder spezifischen Knochenmarkers durch einen direkten Partikeleffekt oder indirekt über den einsetzenden Zelltod verursacht wird (Allen, Myer et al. 1997; Pioletti, Takei et al. 1999). Zukünftig sollten Verfahren entwickelt werden, die diese Beurteilung ermöglichen.

Letztlich ist die aseptische Endoprothesenlockerung nach wie vor ein zukunftssträchtiges und interessantes Forschungsfeld. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen trotz der genannten Limitationen, dass insbesondere durch technische Veränderungen der Partikelabrieb modifiziert werden kann, was sich positiv auf das umgebende periprothetische Gewebe auswirken kann. Zukünftiges Ziel sollte es sein, die umfassenden Erkenntnisse auf technischer sowie molekularbiologischer Ebene in einen Kontext zu bringen. Der dargestellte Versuchsaufbau stellt eine Basis zur Realisierung dieser Forschungsarbeiten dar.

5. Zusammenfassung

Für das Frühversagen eines künstlichen Hüftgelenkes können Infektionen, Luxationen, Knochen- und Implantatbrüche ursächlich sein. Eine der häufigsten Komplikationen nach Implantation einer Hüftendoprothese und Hauptursache für verkürzte Standzeiten ist jedoch die aseptische Lockerung. Diese ist nach aktuellem Stand der Wissenschaft in einer Reaktion des periprothetischen Gewebes auf Abriebpartikel begründet. Einflussfaktoren auf die Entstehung von Abriebpartikeln nach Implantation eines zementierten Hüftendoprothesenstiels sind unter anderem das verwendete Implantatmaterial, Designaspekte und Oberflächenmodifikationen sowie die Eigenschaften des eingesetzten Knochenzementes.

In-vivo treten nach dem Debonding der Grenzfläche von Knochenzement und Implantat Mikrobewegungen auf, die zu Abriebvorgängen mit Freisetzung von Abriebpartikeln führen. Diese können in das umliegende periprothetische Gewebe gelangen und nach Kontakt mit den ortsständigen Zellen eine Kaskade zellulärer Interaktionen initiieren. Dabei spielt für die Schädigung des umliegenden Knochengewebes insbesondere die Freisetzung pro-osteolytischer Zytokine (z.B. $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 und IL-6) eine wichtige Rolle. Hieran sind vor allem Fibroblasten, Makrophagen und Osteoklasten beteiligt. In der Literatur wurde ein direkter Einfluss der Abriebpartikel auf die Funktion von Osteoblasten und das Knochen-Remodelling beschrieben. Inwieweit Osteoblasten nach Kontakt mit den Partikeln selbst die Zytokinsynthese im periprothetischen Gewebe beeinflussen, ist bislang unklar. Es existieren zudem nur wenige Studien, die sich mit dem Zellverhalten im Rahmen der Entstehung der Partikelkrankheit nach Veränderungen im Interface von Implantat und Knochenzement beschäftigen.

Ziel dieser Arbeit ist es, verschiedene Einflussfaktoren auf die aseptische Lockerung von zementierten Hüftendoprothesenstielen in einem In-vitro-Modell zu evaluieren. Damit war die reproduzierbare Herstellung von Abriebprodukten und die Untersuchung des Abrasionsverhaltens zementierter Hüftendoprothesenstiele in der Grenzfläche Implantat und Knochenzement verbunden. Mittels einer speziellen Prüfvorrichtung sollte der Einfluss durch Veränderung von Werkstoff und Oberflächenbeschaffenheit des Stiels analysiert und Abriebpartikel generiert werden. Nachfolgend sollten in der vorliegenden Arbeit die Reaktionen humaner Osteoblasten auf verschiedene Abriebpartikel und deren Beteiligung an der

Produktion inflammatorischer Zellmediatoren untersucht werden. Dabei wurden die zellulären Reaktionen durch die Vitalität, die Syntheseleistung von Matrix-Proteinen und die Freisetzung von Zellmediatoren evaluiert.

Die Abriebpartikel wurden dazu in einer speziellen Prüfvorrichtung unter konstanten Umgebungsvariablen hergestellt. Definierte oszillierende Mikrobewegungen wurden dabei unter konstantem radialen Anpressdruck über drei Millionen Belastungszyklen in die Grenzfläche eines anatomisch geformten Hüftendoprothesenstiels und Knochenzement eingeleitet. Für die Analyse des Abriebverhaltens und der zellbiologischen Eigenschaften auf Abriebpartikel erfolgte eine Variation des Werkstoffes und der Oberflächeneigenschaften. Dabei kamen TiAl6Nb7- und CoCr28Mo6-Legierungen mit rauen ($R_z = 20 \mu\text{m}$) und glatt gestrahlten ($R_z = 7 \mu\text{m}$) Oberflächen zur Anwendung. Die Zementköcher wurden aus PMMA-Zement, der radio-opake Zirkondioxid-Partikel enthielt, hergestellt.

Die generierten Partikel wurden hinsichtlich Menge, Zusammensetzung und Größenverteilung untersucht. In der Betrachtung der Gesamtmenge der freigesetzten Partikel (inklusive Knochenzement und metallischem Abrieb) konnte insbesondere im Hinblick auf die Oberflächentopographie deutliche Unterschiede festgestellt werden. Raue Stiele generierten unter identischen Abriebbedingungen beträchtlich mehr Gesamtabrieb. Ebenfalls war ein Unterschied in der Abriebmenge zwischen den CoCr28Mo6- und TiAl6Nb7-Legierungen bei gleicher Oberflächenbeschaffenheit festzustellen. Auch führten Stiele mit rauen Oberflächen zu einer höheren Freisetzung metallischer Partikel. Die höchste Konzentration metallischer Partikel wurde im Abriebmaterial der rauen TiAl6Nb7-Stiele gefunden. Die niedrigsten Mengen wurden indessen durch glatte TiAl6Nb7-Stiele generiert und zeigten einen signifikanten Unterschied zu den glatten CoCr28Mo6-Stielen.

In der morphologischen Analyse und Größenverteilung der Abriebpartikel konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Werkstoffen und Oberflächenmodifikationen dargestellt werden. Mehr als 90 % aller Partikel waren kleiner als $13 \mu\text{m}$ und lagen damit im Bereich der durch Osteoblasten phagozytierbaren Partikelgröße.

Neben den im Partikelprüfstand hergestellten Abriebpartikeln wurden kommerziell erhältliche Reintitan-Partikel und Zirkondioxid-Partikel in den zellbiologischen Untersuchungen vergleichend untersucht.

Zur Bestimmung der zellulären Antwort auf Abriebpartikel wurden primäre humane Osteoblasten kultiviert. Diese wurden aus der Spongiosa von Hüftköpfen isoliert, welche im Rahmen einer elektiven Hüftendoprothesen-Implantation gewonnen wurden. Die kultivierten Osteoblasten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationsstufen der genannten Partikelentitäten von 0,01 mg/ml über 0,1 mg/ml bis 1,0 mg/ml inkubiert.

Die Zellvitalität wurde mittels MTT-Test bestimmt. Hier konnte eine Dosis-abhängige Beeinflussung bei allen Partikelentitäten ermittelt werden. Eine signifikant negative Beeinflussung konnte durch die Inkubation mit Abriebpartikeln aus den Versuchen mit rauen und glatten CoCr28Mo6-Stielen ermittelt werden. Konzentrationen von 1,0 mg/ml reduzierten nach 96 Stunden den Anteil lebender Zellen auf unter 50 % gegenüber der partikelfreien Kontrolle. Zirkondioxid-Partikel hatten hingegen keinen signifikanten Effekt.

Über die Sekretion des Carboxy-terminalen Propeptids des Typ I Kollagens konnten ähnlich zum MTT-Test konzentrationsabhängige negative Einflüsse auf die Proteinbiosynthese bzw. Matrixproduktion humaner Osteoblasten durch Abriebpartikel gezeigt werden.

Besonders ausgeprägt war dieser Effekt als Folge der Exposition mit Reintitan-Partikeln und Partikeln von rauen CoCr28Mo6-Stielen. Osteoblasten-stimulierende Effekte wurden dagegen für niedrige Konzentrationen von cp-Ti-Partikeln beobachtet.

Mittels eines speziellen Multiplex Cytokine Assays wurde die Analyse der Zytokin-Synthese der humanen Osteoblasten analysiert. Analog fand sich eine Konzentrationsabhängigkeit der eingesetzten Partikel auf die Synthese pro-osteolytischer Zellmediatoren. Für IL-6 konnte eine frühe partikelinduzierte Modifizierung der Sekretion besonders bei Partikeln rauer TiAl6Nb7-Stiele und bei kommerziellen cp-Ti-Partikeln gezeigt werden, jedoch ohne statistische Signifikanz zwischen den einzelnen Partikelentitäten. Eine deutliche Reduktion der IL-6-Synthese war jedoch durch die Verwendung der Maximalkonzentrationen nahezu aller Partikel bis auf Zirkondioxid zu verzeichnen. Wenngleich in geringerer Ausprägung konnte dieses Verhalten auch für IL-8 gezeigt werden. Eine relevante Expression von TNF- α konnte nicht detektiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass raue Oberflächen zementierter Hüftenendoprothesenstiele zum einen die Menge an generiertem Gesamtabrieb als

auch den Anteil der metallischen Partikel erhöht. In den zellbiologischen Untersuchungen zeigten sich deutliche osteoblastische Reaktionen auf die Abriebpartikel aus der Grenzfläche von Hüftendoprothesenstiel. Der biologische Effekt war durch einen höheren Gehalt an metallischen Partikeln im Abrieb deutlicher ausgeprägt. Zytotoxische Effekte waren insbesondere bei Kobalt-Chrom-Partikeln vorzufinden. Titanpartikel hingegen führten vermehrt zu einer Stimulation der Synthese pro-osteolytischer Zytokine. Damit lässt sich schlussfolgern, dass sich eine Modifikation des Hüftstiels hinsichtlich Oberflächentopographie und Werkstoff über die Qualität und Quantität des generierten Abriebs auf die Proliferation und Matrixsynthese humaner Knochenzellen auswirken. Das veränderte Expressionsmuster zelleigener Proteine und Zytokine fördert dabei die Entstehung osteolytischer Prozesse. Das Verständnis der Pathogenese könnte zukünftig ein effektiver Ansatz zur Therapie und der Prävention der aseptischen Lockerung darstellen.

6. Verzeichnisse

6.1. Literaturverzeichnis

- Agins, H. J., N. W. Alcock, et al. (1988). "Metallic wear in failed titanium-alloy total hip replacements. A histological and quantitative analysis." J Bone Joint Surg Am **70**(3): 347-356.
- Akisue, T., T. W. Bauer, et al. (2002). "The effect of particle wear debris on NFkappaB activation and pro-inflammatory cytokine release in differentiated THP-1 cells." J Biomed Mater Res **59**(3): 507-515.
- Allen, M. J., B. J. Myer, et al. (1997). "The effects of particulate cobalt, chromium and cobalt-chromium alloy on human osteoblast-like cells in vitro." J Bone Joint Surg Br **79**(3): 475-482.
- Amstutz, H., J. Cuckler, et al. (1993). "Symposium: Osteolysis in total joint replacement." Contemporary Orthopaedics **27**: 47-78.
- Anissian, L., A. Stark, et al. (2002). "Cobalt ions influence proliferation and function of human osteoblast-like cells." Acta Orthop Scand **73**(3): 369-374.
- Anthony, P., G. Gie, et al. (1990). "Localised endosteal bone lysis in relation to the femoral components of cemented THAs." J Bone Joint Surg [Br] **72-B**: 971-979.
- Bader, R., W. Mittelmeier, et al. (2005). "Abriebverhalten von zementierten Hüftendoprothesen-Stielen. Einfluss der Knochenzement-Zusammensetzung." Materials Testing **47**(4): 175-180.
- Bader, R., R. Scholz, et al. (2004). "The influence of head and neck geometry on stability of total hip replacement: a mechanical test study." Acta Orthop Scand **75**(4): 415-421.
- Bader, R., E. Steinhauser, et al. (2005). "Einfluss der Knochenzement-Zusammensetzung auf das Abriebverhalten von zementierten Hüftendoprothesen-Stielen." Materialprüfung **47**: 175-180.
- Bader, R., E. Steinhauser, et al. (2004). "A novel test method for evaluation of the abrasive wear behaviour of total hip stems at the interface between implant surface and bone cement." Proc Inst Mech Eng H **218**(4): 223-230.
- Barrack, R. L. (2000). "Early failure of modern cemented stems." J Arthroplasty **15**(8): 1036-1050.
- Beresford, J., J. Gallagher, et al. (1986). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 and human bone-derived cells in vitro: effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation." Endocrinology **119**(4): 1776-1785.
- Bi, Y., J. M. Seabold, et al. (2001). "Adherent endotoxin on orthopedic wear particles stimulates cytokine production and osteoclast differentiation." J Bone Miner Res **16**(11): 2082-2091.
- Bi, Y., R. R. Van De Motter, et al. (2001). "Titanium particles stimulate bone resorption by inducing differentiation of murine osteoclasts." J Bone Joint Surg Am **83-A**(4): 501-508.
- Bischoff, U. W., M. A. Freeman, et al. (1994). "Wear induced by motion between bone and titanium or cobalt-chrome alloys." J Bone Joint Surg Br **76**(5): 713-716.
- Bowditch, M. and R. Villar (2001). "Is titanium so bad? Medium-term outcome of cemented titanium stems." J Bone Joint Surg Br **83**(5): 680-685.

- Boyer, P., J. Y. Lazennec, et al. (2009). "Clinical and biological assessment of cemented titanium femoral stems: an 11-year experience." Int Orthop **33**(5): 1209-1215.
- Brandwood, A., K. Noble, et al. (1992). "Phagocytosis of carbon particles by macrophages in vitro." Biomaterials **13**: 646-648.
- Breusch, S. J., P. R. Aldinger, et al. (2000). "[Anchoring principles in hip endoprostheses. I: Prosthesis stem]." Unfallchirurg **103**(11): 918-931.
- Breusch, S. J. and K. D. Kühn (2003). "[Bone cements based on polymethylmethacrylate]." Orthopade **32**(1): 41-50.
- Breusch, S. J., U. Schneider, et al. (2000). "[Effects of the cementing technique on cementing results concerning the coxal end of the femur]." Orthopade **29**(3): 260-270.
- Brien, W. W., E. A. Salvati, et al. (1992). "Metal levels in cemented total hip arthroplasty. A comparison of well-fixed and loose implants." Clin Orthop Relat Res(276): 66-74.
- Browne, M. and P. J. Gregson (1994). "Surface modification of titanium alloy implants." Biomaterials **15**(11): 894-898.
- Buchhorn, G. H., H. G. Willert, et al. (1992). Preparation, Characterization, and Animal Testing for Biocompatibility of Metal Particles of Iron-, Cobalt-, and Titanium-Based Implant Alloys. Particulate Debris from Medical Implants: Mechanisms of Formation and Biological Consequences. ASTM STP 1144. K. R. St. John. Philadelphia, American Society of Testing and Materials: 177-188.
- Cannestra, V. P., R. A. Berger, et al. (2000). "Hybrid total hip arthroplasty with a precoated offset stem. Four to nine-year results." J Bone Joint Surg Am **82**(9): 1291-1299.
- Chang, P. B., K. A. Mann, et al. (1998). "Cemented femoral stem performance. Effects of proximal bonding, geometry, and neck length." Clin Orthop Relat Res(355): 57-69.
- Cheal, E. J., M. Spector, et al. (1992). "Role of loads and prosthesis material properties on the mechanics of the proximal femur after total hip arthroplasty." J Orthop Res **10**(3): 405-422.
- Childs, L. M., J. J. Goater, et al. (2001). "Efficacy of etanercept for wear debris-induced osteolysis." J Bone Miner Res **16**(2): 338-347.
- Chiu, R., T. Ma, et al. (2006). "Polymethylmethacrylate particles inhibit osteoblastic differentiation of bone marrow osteoprogenitor cells." J Biomed Mater Res **77**(4): 850-856.
- Choi, M. G., H. S. Koh, et al. (2005). "Effects of titanium particle size on osteoblast functions in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(12): 4578-4583.
- Chu, P. K., J. Y. Chen, et al. (2002). "Plasma-surface modification of biomaterials." Materials Science and Engineering **36**: 143-2006.
- Ciapetti, G., D. Granchi, et al. (2000). "In vitro testing of ten bone cements after different time intervals from polymerization." J Biomater Sci Polym Ed **11**(5): 481-493.
- Collis, D. K. and C. G. Mohler (1998). "Loosening rates and bone lysis with rough finished and polished stems." Clin Orthop Relat Res(355): 113-122.
- Collis, D. K. and C. G. Mohler (2002). "Comparison of clinical outcomes in total hip arthroplasty using rough and polished cemented stems with essentially the same geometry." J Bone Joint Surg Am **84-A**(4): 586-592.
- Cowles, E. A., M. E. DeRome, et al. (1998). "Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development." Calcif Tissue Int **62**(1): 74-82.

- Crowninshield, R., J. Jennings, et al. (1998). "Cemented femoral component surface finish mechanics." Clin Orthop **355**: 90.
- Davies, J. P., G. Singer, et al. (1992). "The effect of a thin coating of polymethylmethacrylate on the torsional fatigue strength of the cement-metal interface." J Appl Biomater **3**(1): 45-49.
- Della Valle, A. G., A. Zoppi, et al. (2005). "A rough surface finish adversely affects the survivorship of a cemented femoral stem." Clin Orthop Relat Res(436): 158-163.
- Duffy, G. P., A. J. Lozynsky, et al. (2006). "Polished vs rough femoral components in grade A and grade C-2 cement mantles." J Arthroplasty **21**(7): 1054-1063.
- Ebramzadeh, E., A. Sarmiento, et al. (1994). "The cement mantle in total hip arthroplasty. Analysis of long-term radiographic results." J Bone Joint Surg Am **76**(1): 77-87.
- Eingartner, C., A. Ihm, et al. (2002). "[Good long term results with a cemented straight femoral shaft prosthesis made of titanium]." Unfallchirurg **105**(9): 804-810.
- Eingartner, C., R. Volkmann, et al. (1997). "[Low loosening rate of a cemented titanium straight shaft prosthesis in long-term follow-up]." Swiss Surg **3**(2): 49-54.
- Eingartner, C., R. Volkmann, et al. (2001). "Results of a cemented titanium alloy straight femoral shaft prosthesis after 10 years of follow-up." Int Orthop **25**(2): 81-84.
- Eingartner, C., R. Volkmann, et al. (2000). "Results of an uncemented straight femoral shaft prosthesis after 9 years of follow-up." J Arthroplasty **15**(4): 440-447.
- Fleury, C., A. Petit, et al. (2006). "Effect of cobalt and chromium ions on human MG-63 osteoblasts in vitro: morphology, cytotoxicity, and oxidative stress." Biomaterials **27**(18): 3351-3360.
- Friedman, R., J. Black, et al. (1993). "Current concepts in orthopaedic biomaterials and implant fixation." J Bone Joint Surg [Am] **75**: 1086-1109.
- Fritz, E., T. Glant, et al. (2006). "Chemokine gene activation in human bone marrow-derived osteoblasts following exposure to particulate wear debris." J Biomed Mater Res **77**(1): 192-201.
- Fritz, E., J. Jacobs, et al. (2005). "Chemokine IL-8 induction by particulate wear debris in osteoblasts is mediated by NF-KB." J Orthop Res **23**: 1249-1257.
- Gallo, J., P. Kamínek, et al. (2002). "Particle disease. A comprehensive theory of periprosthetic osteolysis: a review." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **146**(2): 21-28.
- Glant, T., J. Jacobs, et al. (1993). "Bone resorption activity of particulate-stimulated macrophages." J Bone and Min Res **8**: 1071-1079.
- Glant, T. T., J. J. Jacobs, et al. (1996). "Particulate-Induced, Prostaglandin- and Cytokine-Mediated Bone Resorption in an Experimental System and in Failed Joint Replacements." Am J Ther **3**(1): 27-41.
- Glant, T. T., J. Yao, et al. (1996). Induction of Bone Resorbing Agents by Titanium Particulates: Responses of Macrophages, Fibroblasts and Osteoblasts In Vitro. Medical Application of Titanium and Its Alloys: The Material and Biological Issues, ASTM STP 1272. S. A. Brown and J. E. Lemons, American Society for Testing and Materials.
- Goodman, S., G. Knoblich, et al. (1996). "Heterogeneity in cellular and cytokine profiles from multiple samples of tissue surrounding revised hip prostheses." J Biomed Mater Res **31**: 421-428.

- Goodman, S., T. Ma, et al. (2006). "Review: Effects of orthopaedic wear particles on osteoprogenitor cells." Biomaterials **27**: 6096-6101.
- Goodman, S. B. (2007). "Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system." Biomaterials **28**(34): 5044-5048.
- Goodman, S. B., M. Lind, et al. (1998). "In vitro, in vivo, and tissue retrieval studies on particulate debris." Clin Orthop Relat Res(352): 25-34.
- Goodman, S. B. and T. Ma (2010). "Cellular chemotaxis induced by wear particles from joint replacements." Biomaterials **31**(19): 5045-5050.
- Haleem-Smith, H., E. Argintar, et al. (2012). "Biological responses of human mesenchymal stem cells to titanium wear debris particles." J Orthop Res **30**(6): 853-863.
- Hallan, G., B. Espehaug, et al. (2012). "Is there still a place for the cemented titanium femoral stem? 10,108 cases from the Norwegian Arthroplasty Register." Acta Orthop **83**(1): 1-6.
- Haynes, D. R., S. D. Rogers, et al. (1993). "The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles." J Bone Joint Surg Am **75**(6): 825-834.
- He, T., W. Wu, et al. (2013). "Multiple biomarkers analysis for the early detection of prosthetic aseptic loosening of hip arthroplasty." Int Orthop **37**(6): 1025-1031.
- Heinemann, D. E., C. Lohmann, et al. (2000). "Human osteoblast-like cells phagocytose metal particles and express the macrophage marker CD68 in vitro." J Bone Joint Surg Br **82**(2): 283-289.
- Herberts, P. and H. Malchau (2000). "Long-term registration has improved the quality of hip replacement: a review of the Swedish THR Register comparing 160,000 cases." Acta Orthop Scand **71**(2): 111-121.
- Hinrichs, F., U. Boudriot, et al. (2000). "[10 year results with a cemented fine-grit-blasted titanium-aluminum-vanadium hip endoprosthesis shaft]." Z Orthop Ihre Grenzgeb **138**(1): 52-56.
- Hinrichs, F., M. Kuhl, et al. (2003). "A comparative clinical outcome evaluation of smooth (10–13 year results) versus rough surface finish (5–8 year results) in an otherwise identically designed cemented titanium alloy stem." Arch Orthop Trauma Surg **123**: 268-272.
- Hirakawa, K., J. J. Jacobs, et al. (2004). "Mechanisms of failure of total hip replacements: lessons learned from retrieval studies." Clin Orthop Relat Res(420): 10-17.
- Holding, C., D. Findlay, et al. (2006). "The correlation of RANK, RANKL and TNF- α expression with bone loss volume and polyethylene wear debris around hip implants." Biomaterials **27**: 5212–5219.
- Howie, D. W., R. G. Middleton, et al. (1998). "Loosening of matt and polished cemented femoral stems." J Bone Joint Surg Br **80**(4): 573-576.
- Howie, D. W., S. D. Rogers, et al. (1996). "Biologic effects of cobalt chrome in cell and animal models." Clin Orthop Relat Res(329 Suppl): S217-232.
- Hudetz, D., E. Rod, et al. (2012). "Diagnosis and treatment of peri-prosthetic infections in total hip replacement." Med Glas Ljek komore Zenicko-dobojskanton **9**(1): 152-159.
- Ingham, E., T. R. Green, et al. (2000). "Production of TNF- α and bone resorbing activity by macrophages in response to different types of bone cement particles." Biomaterials **21**(10): 1005-1013.
- Ingram, J. H., R. Kowalski, et al. (2005). "The osteolytic response of macrophages to challenge with particles of Simplex P, Endurance, Palacos R, and

- Vertebroplastic bone cement particles in vitro." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **75**(1): 210-220.
- Ito, S., T. Matsumoto, et al. (2004). "Histological analysis and biological effects of granulation tissue around loosened hip prostheses in the development of osteolysis." J Orthop Sci **9**: 478-487.
- Jergesen, H. E. and J. W. Karlen (2002). "Clinical outcome in total hip arthroplasty using a cemented titanium femoral prosthesis." J Arthroplasty **17**(5): 592-599.
- Jones, L., C. Frondoza, et al. (1999). "Immunohistochemical evaluation of interface membranes from failed cemented and uncemented acetabular components." J Biomed Mater Res **48**: 889-898.
- Kim, K. J., S. Kotake, et al. (2001). "Osteoprotegerin inhibits in vitro mouse osteoclast formation induced by joint fluid from failed total hip arthroplasty." J Biomed Mater Res **58**(4): 393-400.
- Kręcis, B., M. Kieć-Świerczyńska, et al. (2012). "Allergy to orthopedic metal implants - a prospective study." Int J Occup Med Environ Health **25**(4): 463-469.
- Kwan Tat, S., M. Padrines, et al. (2004). "IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology." Cytokine Growth Factor Rev **15**(1): 49-60.
- La Budde, J. K., J. F. Orosz, et al. (1994). "Particulate titanium and cobalt-chrome metallic debris in failed total knee arthroplasty. A quantitative histologic analysis." J Arthroplasty **9**(3): 291-304.
- Landgraeber, S., F. Löer, et al. (2010). "Tartrate-resistant acid phosphatase 5b and C-terminal telopeptides of type I collagen as markers for diagnosis of aseptic loosening after total hip replacement." Arch Orthop Trauma Surg **130**(4): 441-445.
- Lee, S. H., F. R. Brennan, et al. (1997). "Human Monocyte/Macrophage Response to Cobalt-Chromium Corrosion Products and Titanium Particles in Patients With Total Joint Replacements." J Orthop Res **15**(1): 40-49.
- Lenz, R., W. Mittelmeier, et al. (2009). "Response of human osteoblasts exposed to wear particles generated at the interface of total hip stems and bone cement." J Biomed Mater Res A **89**(2): 370-378.
- Lichtinger, T. K., N. Schürmann, et al. (2000). "[Early loosening of a cemented hip endoprosthesis stem of titanium]." Unfallchirurg **103**(11): 956-960.
- Lohmann, C., D. Dean, et al. (2002). "Ceramic and PMMA particles differentially affect osteoblast phenotype." Biomaterials **23**(8): 1855-1863.
- Lohmann, C. H., Z. Schwartz, et al. (2000). "Phagocytosis of wear debris by osteoblasts affects differentiation and local factor production in a manner dependent on particle composition." Biomaterials **21**(6): 551-561.
- Long, M. and H. J. Rack (1998). "Titanium alloys in total joint replacement--a materials science perspective." Biomaterials **19**(18): 1621-1639.
- Maier, G. S., C. Eberhardt, et al. (2014). "Is tartrate-resistant acid phosphatase 5b a potent bio-marker for late stage aseptic implant loosening?" Int Orthop.
- Mann, K. A., D. L. Bartel, et al. (1991). "Mechanical characteristics of the stem-cement interface." J Orthop Res **9**(6): 798-808.
- Mann, K. A., M. A. Miller, et al. (2008). "Experimental micromechanics of the cement-bone interface." J Orthop Res **26**(6): 872-879.
- Massoud, S. N., J. B. Hunter, et al. (1997). "Early femoral loosening in one design of cemented hip replacement." J Bone Joint Surg Br **79**(4): 603-608.
- McCalden, R. W., K. D. Charron, et al. (2011). "Does morbid obesity affect the outcome of total hip replacement?: an analysis of 3290 THRs." J Bone Joint Surg Br **93**(3): 321-325.

- Mcgrath, L. R., D. L. Shardlow, et al. (2001). "A retrieval study of capital hip prostheses with titanium alloy femoral stems." J Bone Joint Surg Br **83**(8): 1195-1201.
- Morscher, E. W. (2003). "Failures and successes in total hip replacement--why good ideas may not work." Scand J Surg **92**(2): 113-120.
- Morscher, E. W. and D. Wirz (2002). "Current state of cement fixation in THR." Acta Orthop Belg **68**(1): 1-12.
- Nakashima, Y., D. Sun, et al. (1999). "Signaling Pathways for Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6 Expression in Human Macrophages Exposed to Titanium-Alloy Particulate Debris in Vitro." J Bone Joint Surg [Am] **81**: 603-615.
- Neuß, M., S. Clemens, et al. (2005). "Is the implantation of titanium stems in hip prostheses really obsolete?" Z Orthop **143**(3): 337-342.
- O'Connor, D. T., M. G. Choi, et al. (2004). "New insight into the mechanism of hip prosthesis loosening: effect of titanium debris size on osteoblast function." J Orthop Res **22**(2): 229-236.
- Ostendorf, M., O. Johnell, et al. (2002). "The epidemiology of total hip replacement in The Netherlands and Sweden: present status and future needs." Acta Orthop Scand **73**(3): 282-286.
- Pedersen, A. B., F. Mehnert, et al. (2010). "Risk of revision of a total hip replacement in patients with diabetes mellitus: a population-based follow up study." J Bone Joint Surg Br **92**(7): 929-934.
- Petit, A., I. Catelas, et al. (2002). "Differential apoptotic response of J774 macrophages to alumina and ultra-high-molecular-weight polyethylene particles." J Orthop Res **20**(1): 9-15.
- Pioletti, D. P., H. Takei, et al. (1999). "The cytotoxic effect of titanium particles phagocytosed by osteoblasts." J Biomed Mater Res **46**(3): 399-407.
- Purdue, P. E., P. Koulouvaris, et al. (2006). "The central role of wear debris in periprosthetic osteolysis." HSS J **2**(2): 102-113.
- Purdue, P. E., P. Koulouvaris, et al. (2007). "The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis." Clin Orthop Relat Res **454**: 251-261.
- Rader, C. P., C. Hendrich, et al. (2000). "[5- to 8-year results of total hip endoprosthesis implantation with the Müller straight shaft prosthesis (cemented TiAlNb shaft)]." Unfallchirurg **103**(10): 846-852.
- Ramaniraka, N. A., L. R. Rakotomanana, et al. (2000). "The fixation of the cemented femoral component. Effects of stem stiffness, cement thickness and roughness of the cement-bone surface." J Bone Joint Surg [Br] **82-B**(1): 297-303.
- Rasquinha, V., C. Ranawat, et al. (2004). "A prospective, randomized, double-blind study of smooth versus rough stems using cement fixation." J Arthroplasty **19**(2): 2-9.
- Rubash, H. E., R. K. Sinha, et al. (1998). "Pathogenesis of bone loss after total hip arthroplasty." Orthop Clin North Am **29**(2): 173-186.
- Salvati, E. A., F. Betts, et al. (1993). "Particulate metallic debris in cemented total hip arthroplasty." Clin Orthop Relat Res(293): 160-173.
- Santavirta, S., J. W. Xu, et al. (1998). "Activation of periprosthetic connective tissue in aseptic loosening of total hip replacements." Clin Orthop Relat Res(352): 16-24.
- Schmalzried, T. P., C. A. Zahiri, et al. (2000). "The significance of stem-cement loosening of grit-blasted femoral components." Orthopedics **23**(11): 1157-1164.

- Schöll, E., S. Eggli, et al. (2000). "Osteolysis in cemented titanium alloy hip prosthesis." J Arthroplasty **15**(5): 570-575.
- Schulze, C., K. Lochner, et al. (2013). "Cell viability, collagen synthesis and cytokine expression in human osteoblasts following incubation with generated wear particles using different bone cements." Int J Mol Med **32**(1): 227-234.
- Shanbhag, A., J. Jacobs, et al. (1995). "Human monocyte response to particulate biomaterials generated in vivo and in vitro." J Orthop Res **13**: 792-801.
- Shardlow, D., M. Stone, et al. (2003). "Cement particles containing radio-opacifiers stimulate pro-osteolytic cytokine production from a human monocytic cell line." J Bone Joint Surg [Br] **85-B**: 900-905.
- Simon, L., S. Krane, et al. (1984). "Serum levels of Type I and III procollagen fragments in Paget's disease of bone." J Clin Endocrinol Metab **58**: 110-120.
- Smith, R. L. and E. M. Schwarz (2014). "Are biologic treatments a potential approach to wear- and corrosion-related problems?" Clin Orthop Relat Res **472**(12): 3740-3746.
- Streit, M. R., C. Merle, et al. (2011). "Late peri-prosthetic femoral fracture as a major mode of failure in uncemented primary hip replacement." J Bone Joint Surg Br **93**(2): 178-183.
- Takagi, M., S. Santavirta, et al. (2001). "High-turnover periprosthetic bone remodeling and immature bone formation around loose cemented total hip joints." J Bone Miner Res **16**(1): 79-88.
- Tompkins, G. S., P. F. Lachiewicz, et al. (1994). "A prospective study of a titanium femoral component for cemented total hip arthroplasty." J Arthroplasty **9**(6): 623-630.
- Ungethüm, M. and W. Winkler-Gniewek (1984). "Metallische Werkstoffe in der Orthopädie und Unfallchirurgie." Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Vermes, C., R. Chandrasekaran, et al. (2001). "The effects of particulate wear debris, cytokines, and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts." J Bone Joint Surg Am **83-A**(2): 201-211.
- Vermes, C., T. T. Glant, et al. (2001). "The potential role of the osteoblast in the development of periprosthetic osteolysis: review of in vitro osteoblast responses to wear debris, corrosion products, and cytokines and growth factors." J Arthroplasty **16**(8 Suppl 1): 95-100.
- Wang, M., L. Nesti, et al. (2002). "Titanium particles suppress expression of osteoblastic phenotype in human mesenchymal stem cells." J Orthop Res **20**: 1175-1184.
- Wilke, A., I. Bartsch, et al. (2005). "Zytokinprofil einer humanen Knochenmarkzellkultur unter dem Einfluss von UHMW-PE Abriebpartikeln." Biomed Technik **50**: 330-336.
- Willert, H. and M. Semlitsch (1976). Tissue reactions to plastic and metallic wear products of joint endoprotheses. Total Hip Protheses. N. Gschwend and H. Debrunner. Baltimore, Williams and Wilkins: 205-239.
- Willert, H. and M. Semlitsch (1977). "Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses." J Biomed Mater Res **11**: 157-164.
- Willert, H. G., L. G. Brobäck, et al. (1996). "Crevice corrosion of cemented titanium alloy stems in total hip replacements." Clin Orthop Relat Res(333): 51-75.
- Willert, H. G., G. H. Buchhorn, et al. (1996). "Wear behavior and histopathology of classic cemented metal on metal hip endoprotheses." Clin Orthop Relat Res(329 Suppl): S160-186.

- Wimmer, M., A. Bluhm, et al. (1998). "Fretting wear of titanium and cobaltchromium alloys against bone cement." Proceedings 44th ORS Meeting, New Orleans: 353.
- Yang, I. H., S. Y. Kim, et al. (1999). "Fabrication of submicron titanium-alloy particles for biological response studies." J Biomed Mater Res **48**(3): 220-223.
- Yao, J., G. CS-Szabo, et al. (1997). "Suppression of osteoblast function by titanium particles." J Bone Joint Surg [Am] **79-A**(1): 107-112.
- Zreiqat, H., T. N. Crotti, et al. (2003). "Prosthetic particles modify the expression of bone-related proteins by human osteoblastic cells in vitro." Biomaterials **24**(2): 337-346.
- Zreiqat, H. and C. R. Howlett (1999). "Titanium substrata composition influences osteoblastic phenotype: In vitro study." J Biomed Mater Res **47**(3): 360-366.
- Zreiqat, H., S. M. Valenzuela, et al. (2005). "The effect of surface chemistry modification of titanium alloy on signalling pathways in human osteoblasts." Biomaterials **26**(36): 7579-7586.

6.2. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1a:** Röntgenaufnahme einer zementierten Hüftendoprothese mit typischen Lysezonen im Bereich des distalen Stiels als Zeichen einer aseptischen Lockerung
- Abb. 1b:** Intraoperativer Situs einer Hüftendoprothesen-Wechseloperation mit Darstellung schwarz gefärbten granulomatösen Gewebes durch metallischen Abrieb um den Endoprothesenstiel
- Abb. 2:** Schematische Übersicht zur Pathophysiologie der aseptischen Lockerung. Unterschiedliche Abriebpartikel bilden das zentrale Element in der Aktivierung gewebsständiger Zellen mit Aktivierung osteolytischer Prozesse.
- Abb. 3:** Komplexe Regulationsmechanismen des Abriebpartikel induzierten Knochenverlustes. Differenzierung von Vorläuferzellen (OCP) im periprothetischen Gewebe zu aktiven Osteoklasten(OC). Knochenresorption durch osteolytische Enzyme wie Cathepsin K, Tartat-resistente saure Phosphatase (TRAP) und Carboanhydrase II (CAII). Interaktion durch verschiedene Zellmediatoren (RANKL, Osteoprotegerin (OPG), Interferon-gamma (IFN)) (aus Purdue et al. 2007)
- Abb. 4a:** Partikelprüfstand zur Herstellung von Abriebpartikeln durch Simulation der Grenzfläche Hüftendoprothesenstiel und Knochenzement
- Abb. 4b:** Detailvergrößerung aus (a): ESV-Stiel = Einspannvorrichtung für den Hüftendoprothesenstiel; ESV ZK = Einspannvorrichtung für den Zementköcher; Fp = Anpresskraft.
- Abb. 4c:** Schematische Darstellung des Simulationsaufbaus. Aufbau einer konstanten Flächenpressung ($F_p=2\text{MPa}$) im Interface Stiel-Zement über eine fixierte sowie zwei uni-axial drehbare Pressbacken.

- Abb. 5a:** Anatomischer zementierter Hüftendoprothesenstiel CAP-M (Peter Brehm Chirurgie Mechanik, Weisendorf, Deutschland) TiAl6Nb7-Legierung
- Abb. 5b:** Anatomischer zementierter Hüftendoprothesenstiel CAP-M (Peter Brehm Chirurgie Mechanik, Weisendorf, Deutschland) CoCr28Mo6-Legierung
- Abb. 5c:** Dreiteiliger Zementköcher hergestellt aus Knochenzement mit 15 % Zirkondioxid (Palacos R[®], Fa. Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland)
- Abb. 6a:** Arbeitsplatz mit verwendetem Atomabsorptionsspektrometer (Spectr AA 30/40 Zeeman, Varian, Darmstadt, Deutschland)
- Abb. 6b:** Schemadarstellung zum Aufbau eines Atomabsorptionsspektrometers
- Abb. 7:** Mastersizer 2000 (Malvern, Worcestershire, Großbritannien) zur Bestimmung der Partikelgröße
- Abb. 8a:** Abriebpartikel aus der Grenzfläche rauer TiAl6Nb7-Hüftendoprothesenstiel und Knochenzement mit 15% Zirkondioxid (Palacos R[®])
- Abb. 8b:** Abriebpartikel aus der Grenzfläche glatter TiAl6Nb7-Hüftendoprothesenstiel und Knochenzement mit 15 % Zirkondioxid (Palacos R[®])
- Abb. 8c:** Abriebpartikel aus der Grenzfläche rauer CoCr28Mo6-Hüftendoprothesenstiel und Knochenzement mit 15 % Zirkondioxid (Palacos R[®])
- Abb. 9:** Natives mikroskopisches Bild (100fache Vergrößerung) einer Kultur humaner Osteoblasten im konfluenten Stadium

- Abb. 10:** Mikroskopische Aufnahme einer Kultur humaner Osteoblasten (400fache Vergrößerung) nach alkalischer Phosphatase-Färbung mit typischer Rotfärbung des osteoblastischen Phänotyps
- Abb. 11:** Einfluss unterschiedlicher Partikeltypen in definierten Konzentrationen (1,0 mg/ml; 0,1mg/ml; 0,01mg/ml) auf das Zellüberleben humaner Osteoblasten dargestellt durch die optische Dichte im MTT-Test nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen
- Abb. 12:** Einfluss unterschiedlicher Partikeltypen in definierten Konzentrationen (1,0 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,01 mg/ml) auf die Synthese des Carboxy-terminalen Propeptids des Typ I Kollagens (CICP) humaner Osteoblasten in ng/ml nach einer Inkubationszeit von 5 bzw. 10 Tagen
- Abb. 13:** Einfluss unterschiedlicher Partikeltypen in definierten Konzentrationen (1,0 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,01 mg/ml) auf die Synthese von Interleukin-6 (IL-6) humaner Osteoblasten in ng/ml nach einer Inkubationszeit von 4 bzw. 9 Tagen
- Abb. 14:** Einfluss unterschiedlicher Partikeltypen in definierten Konzentrationen (1,0 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,01 mg/ml) auf die Synthese von Interleukin-8 (IL-8) humaner Osteoblasten in ng/ml nach einer Inkubationszeit von 4 bzw. 9 Tagen.

6.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abriebmenge und Metallkonzentration in Abrieb aus der Grenzfläche Hüftendoprothesenstiel (CAP-M mit TiAl6Nb7- bzw. CoCr28Mo6-Legierung) mit rauher bzw. glatter Oberfläche und PMMA-Knochenzement (Palacos® R)

Tabelle 2: Größenverteilung der Abriebpartikel aus der Grenzfläche Hüftendoprothesenstiel (CAP-M mit TiAl6Nb7- bzw. CoCr28Mo6-Legierung) mit rauher bzw. glatter Oberfläche und PMMA-Knochenzement (Palacos® R) bestimmt im Mastersizer 2000. (d(x) entspricht der Perzentile)

6.4. Chemikalienverzeichnis

Aceton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$)

Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Amphotericin B 1 %

Fa. Gibco, Invitrogen-Gibco Cell Culture Products, Carlsbad, Kalifornien, USA

Anti-CICP-Antikörper Metra™ CICP EIA Kit

Fa. Quidel, Marburg, Deutschland

β -Glycerophosphat

Fa. Sigma, St. Louis, Missouri, USA

Bio-Plex Cytokine Assay

Fa. Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA

Brij® 35 Solution 30 %

Fa. Sigma Diagnostics, St. Louis, Missouri, USA

Collagenase A

Fa. Roche, Penzberg, Deutschland

cp-Ti Grade E

Fa. Chemetall, Frankfurt, Deutschland

Dimethylsulfoxid (DMSO)($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$)

Fa. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland

Dispase II

Fa. Roche, Penzberg, Deutschland

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

3,7 g / l NaHCO_3 ; 2,5 mM HEPES; 4,5 g / l D-Glucose; 4,4 g / l NaCl;

Na-Pyruvate, L-Glutamine

Fa. Biochrome AG, Berlin, Deutschland

Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 70 %

Apotheke Universitätsklinik Rostock

Fetales Kälberserum 10 % (FBS)

Fa. Gibco, Invitrogen-Gibco Cell Culture Products, Carlsbad, Kalifornien, USA

Glycerin ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)

Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Hydroxylammoniumchlorid 100 g/l ($\text{H}_3\text{NO} \cdot \text{HCl}$)

Fa. Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Deutschland

Kobalt-Standardlösung 1000 mg/l

Kobalt-(II)-nitrat in Salpetersäure 0,5 mol/l

Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

L-Ascorbat-2-phosphat

Fa. Sigma, St. Louis, Missouri, USA

MTT- Kit, Cell Proliferation Kit I

Fa. Roche, Mannheim, Deutschland

N,N-Dimethylformamid (DMF) ($\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$)

Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Palladium-(II)-chlorid 2 g/l

Modifizier für die AAS in HNO_3 6,5 %

Fa. Johnson, Matthey, Karlsruhe, Deutschland

Penicillin 1 %

Fa. Gibco, Invitrogen-Gibco Cell Culture Products, Carlsbad, Kalifornien, USA

Phosphate buffered saline (PBS) pH 7,4

NaCl 0,138 M, KCl 0,0027 M

Fa. Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Deutschland

Polykristalline ZrO₂ Partikel (Korngröße 1,75 ± 4,66 µm) Selectipur

Fa. Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland

Salzsäure 37 % (HCl)

Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Streptomycin 1 %

Fa. Gibco, Invitrogen-Gibco Cell Culture Products, Carlsbad, Kalifornien, USA

Titan-Standardlösung 1000 mg / l

TiCl₄ in HCl 5 mol/l

Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Testkit zur alkalischen Phosphatase Färbung

Fa. DakoCytomation, Carpinteria, Kalifornien, USA

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer (C₄H₁₁NO₃)

Fa. Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim, Deutschland

Trypsin-EDTA Lösung 0,5 %

Fa. Gibco, Invitrogen-Gibco Cell Culture Products, Carlsbad, Kalifornien, USA

6.5. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AAS	Atomabsorptions-Spektrometrie
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
CA II	Carboanhydrase II
CD68	Cluster of Differentiation 68
CICP	Carboxy-terminales Propeptid von Typ I Kollagen
CO ₂	Kohlendioxid
CoCr	Kobalt-Chrom
CoCr28Mo6	Kobalt-Chrom-Molybdän-Legierung
cp Ti	commercially produced Titanium (kommerziell hergestelltes Reintitanpulver)
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EN	Europäische Norm
ESV	Einspannvorrichtung
ESV ZK	Einspannvorrichtung Zementköcher
Fa.	Firma
FBS	Fetal Bovine Serum (fetales Kälberserum)
IFN	Interferon
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
ISO	International Organization for Standardization
KCl	Kaliumchlorid
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
MTT	3-[4.5-Dimethylthiazol-2-yl]-2.5-Diphenyltetrazolium-Bromid
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitro blue tetrazolium chloride
PBS	Phosphate Buffered Saline

PG-E ₂	Prostaglandin E ₂
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen
OC	Osteoclasts
OCP	Osteoclast progenitor cells (Osteoklasten Vorläuferzellen)
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
Ti	Titan
TiAl6Nb7	Titan-Aluminium-Niob-Legierung
TiO ₂	Titandioxid
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
TRAP	Tartat-resistant acid phosphatase (= Tartat-resistente saure Phosphatase)
UHMWPE	Ultra high molecular weight polyethylene
ZIMT	Zentralinstitut für Medizintechnik
ZrO ₂	Zirkondioxid

7. Anhang

7.1. Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Rainer Bader für die Themenvergabe und die Betreuung der Arbeit. Das Vertrauen und die Ausdauer mich zur Vollendung dieser Arbeit zu bewegen. Die wertvollen Anregungen trugen maßgeblich zum Gelingen der Arbeit bei.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Mittelmeier, Direktor der Orthopädischen Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Rostock, für die Möglichkeit, die Promotion an der Klinik durchzuführen.

Des Weiteren danke ich Frau Doris Hansmann, die einen großen Beitrag zu den Laborarbeiten leistete und mir stets zur Seite stand.

Für die Bereitstellung des Atomabsorptionsspektrometers möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Winklmaier von der FH München (Fachbereich Feinwerk- und Mikrotechnik/Physikalische Technik) bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wintermantel vom Zentralinstitut für Medizintechnik der TU München, Garching, für die Möglichkeit der Durchführung von Messungen am Mastersizer.

Bei meiner Mutter bedanke ich mich herzlichst für die Unterstützung in allen Phasen der Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Frau Caroline danken, die mir mit ihrer Liebe die Kraft für die Erstellung der Arbeit gegeben und stets an mich geglaubt hat.

7.3. Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre ausdrücklich, dass es sich bei der von mir eingereichten Dissertation um eine von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasste Arbeit handelt. Sämtliche verwendeten Quellen und Hilfsmittel wurden von mir kenntlich gemacht.

Die in den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Auszüge habe ich als solche kenntlich gemacht.

Rostock, März 2015

Robert Lenz

7.4. Thesen

1. Die häufigste Ursache der frühzeitigen Hüftendoprothesenrevision ist die aseptische Lockerung. Diese beruht auf einer Reaktion des periprotetischen Gewebes auf Abriebpartikel.
2. Abriebpartikel entstehen an der Grenzfläche Hüftendoprothesenstiel und Knochenzement und gelangen durch Spaltbrüche in das periprotetische Gewebe.
3. Der Implantatwerkstoff beeinflusst das Abriebverhalten zementierter Hüftendoprothesenstiele.
4. Die Oberflächenbeschaffenheit des Stiels steht im Zusammenhang mit der produzierten Abriebmenge an der Grenzfläche Hüftendoprothesenstiel und Knochenzement.
5. Zur Untersuchung der Effekte auf Zellüberleben und Metabolismus von Zellen des periprotetischen Gewebes eignen sich humane Osteoblasten, da sie die in-vivo-Bedingungen im Menschen adäquat widerspiegeln.
6. Abriebpartikel aus der Grenzfläche Hüftendoprothesenstiel und Knochenzement wirken sich negativ auf das Zellüberleben aus. Dabei ist die Zellvitalität humaner Osteoblasten vor allem von der Partikelkonzentration im umgebenden Medium abhängig.
7. Insbesondere der Anteil metallischer Partikel senkt die Anzahl vitaler Osteoblasten.
8. Abriebpartikel modulieren die Zellaktivität humaner Osteoblasten konzentrations- und zeitabhängig.

9. Ein reduzierter Zellmetabolismus humaner Osteoblasten mündet in einer Verringerung knochenspezifischer Proteine und schädigt dadurch die periprothetische Knochensubstanz.
10. Titan- und Kobalt-Chrom-Legierungen haben einen unterschiedlichen Einfluss auf das Zellüberleben und den Knochenstoffwechsel.
11. Knochenzementpartikel verursachen negative Zelleffekte.
12. Humane Osteoblasten haben über die Freisetzung von Zytokinen Einfluss auf die interzelluläre Kommunikation und sind damit ein wichtiger pathogenetischer Faktor der aseptischen Lockerung.
13. Es besteht ein Dosis-abhängiger Effekt in der Synthesemenge von pro-osteolytischen Zytokinen durch Osteoblasten nach Inkubation mit Abriebpartikeln aus der Grenzfläche Stiel-Knochenzement.
14. Veränderungen der Implantateigenschaften wirken sich über eine Modulation des Abriebverhaltens indirekt auf die inter- und intrazelluläre Kommunikation aus. Im Hinblick auf die Rate aseptischer Lockerungen könnte diese damit gesenkt werden.